

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Fisiología  
(Fisiología II)



## TESIS DOCTORAL

**Efecto del tratamiento crónico con atenolol, su combinación con la restricción de metionina en la dieta y la ausencia del gen ELOVL2 en la composición lipídica, el estrés oxidativo mitocondrial y la longevidad en roedores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Alexia Gómez Rodríguez**

Directores

Gustavo Barja de Quiroga Losada  
Mónica López Torres

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**  
**(FISIOLÓGÍA ANIMAL II)**



**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON ATENOLOL, SU  
COMBINACIÓN CON LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA Y LA  
AUSENCIA DEL GEN ELOVL2 EN LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA, EL ESTRÉS  
OXIDATIVO MITOCONDRIAL Y LA LONGEVIDAD EN ROEDORES.**

MEMORIA PRESENTADA POR ALEXIA GÓMEZ RODRÍGUEZ PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE DOCTOR EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

MADRID, 2014



**COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID**  
**FACULTY OF BIOLOGICAL SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY**  
**(ANIMAL PHYSIOLOGY II)**



**EFFECT OF CHRONIC ATENOLOL TREATMENT, ITS COMBINATION WITH  
DIETARY METHIONINE RESTRICTION AND THE LACK OF THE ELOVL2 GEN ON  
LIPID COMPOSITION, OXIDATIVE STRESS AND LONGEVITY IN RODENTS.**

THESIS PRESENTED BY ALEXIA GÓMEZ RODRÍGUEZ TO OBTAIN THE PhD DEGREE IN  
BIOLOGY BY THE COMPLUTENSE  
UNIVERSITY OF MADRID

MADRID, 2014





## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II)  
C/ JOSÉ ANTONIO NOVAIS, 2  
28040 – MADRID

Gustavo Barja de Quiroga Losada, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid, y Mónica López Torres, Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Efecto del tratamiento crónico con atenolol, su combinación con la restricción de metionina en la dieta y la ausencia del gen Elov12 en la composición lipídica, el estrés oxidativo mitocondrial y la longevidad en roedores” realizada por D<sup>a</sup> Alexia Gómez Rodríguez bajo nuestra dirección y supervisión en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) para la obtención del título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 12 de junio de 2013.

Dr. Gustavo Barja de Quiroga Losada

Dra. Mónica López Torres





La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Gustavo Barja de Quiroga y la codirección de la Dra. Mónica López Torres. Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo económico prestado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-00335/BFI; BFU2011-23888) y de la Universidad Complutense de Madrid (BSCH-UCM 2009-2010) al Dr. Gustavo Barja, y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-118/79BFI), el Ministerio de Sanidad (ISCIII, Red de Envejecimiento y Fragilidad, RD06/0013/0012) y la Generalitat de Cataluña (2009SGR735) al Dr. Reinald Pamplona. Alexia Gómez Rodríguez ha sido beneficiaria de una beca de postgrado de Formación de Personal Investigador (BES-2009-028125) del Ministerio de Ciencia e Innovación.





%FRL	Fuga porcentual de radicales libres
4-HNE	4-hidroxinonenal
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihidro-2' deoxiguanosina
AA	Antimicina A
AASA	Semialdehído aminoadípico
ACL	Longitud media de la cadena
AC5	Adenilato ciclasa tipo 5
AGEs	Productos finales de la glicoxidación
AIF	Factor inductor de apoptosis
AT	Atenolol
β-AR	Receptor β-adrenérgico
CEL	Nε-(Carboxietil) lisina
CML	Nε-(Carboximetil) lisina.
CoA	Coenzima A
DR	Restricción de dieta
DBI	Índice de dobles enlaces
dG	Deoxiguanosina
ERK	Kinasa regulada por señal extracelular
ELOVL	Elongasa de ácidos grasos de cadena muy larga
FADS	Desaturasas de ácidos grasos
FAS	Ácido graso sintasa
GC/MS	Cromatografía de gases / espectrometría de masas
GSA	Semiadehído glutámico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MDAL	Nε-(malondialdehído)-lisina
MetR	Restricción de metionina
MLSP	Longevidad máxima
MnSOD	Superóxido dismutasa manganeso
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
PI	Índice de peroxidizabilidad
pO <sub>2</sub>	Presión parcial de oxígeno
PR	Restricción proteica
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RCI	Índice de control respiratorio
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ROT	Rotenona
SCD	Estearoil Coenzima A desaturasa
SFA	Ácidos grasos saturados
SIRT	Sirtuina
SOD	Superóxido dismutasa

## Abreviaturas

---

SREBP	Elemento regulador de esterol unido a proteínas
UCP	Proteína desacoplante
UFA	Ácidos grasos insaturados

## **ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. ENVEJECIMIENTO</b>	<b>3</b>
1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS	5
1.2. TEORÍAS DE ENVEJECIMIENTO	6
1.3. TEORÍA MITOCONDRIAL DE ENVEJECIMIENTO POR RADICALES LIBRES	7
<b>2. MITOCONDRIA Y RADICALES LIBRES</b>	<b>9</b>
2.1. ORÍGEN, MORFOLOGÍA Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL	9
2.2. RADICALES LIBRES: PRINCIPALES TIPOS	12
2.3. CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIAL	14
2.4. PRODUCCIÓN DE ROS EN LA MITOCONDRIA Y SU RELACIÓN CON EL ENVEJECIMIENTO	21
2.5. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN LA CADENA RESPIRATORIA	24
<b>3. LÍPIDOS</b>	<b>25</b>
3.1. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA	25
3.2. METABOLISMO LIPÍDICO	25
3.3. MODIFICACIÓN DE LA LONGITUD DE LA CADENA: DESATURASAS Y ELONGASAS	28
3.4. RELACIÓN DE LOS LÍPIDOS CON LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA LONGEVIDAD ANIMAL	32
<b>4. DAÑO OXIDATIVO A MACROMOLÉCULAS</b>	<b>38</b>
4.1. LÍPIDOS	38
4.2. ADN	40
4.3. PROTEÍNAS	44
4.4. HIDRATOS DE CARBONO	46
<b>5. ¿CÓMO INCREMENTAR LA LONGEVIDAD MÁXIMA?º</b>	<b>46</b>
5.1. MANIPULACIONES DIETÉTICAS	46
5.2. MANIPULACIONES GENÉTICAS	50
5.3. MANIPULACIONES FARMACOLÓGICAS	54
<b>OBJETIVOS</b>	<b>57</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>65</b>
- DISEÑO EXPERIMENTAL:	
1. Estudio del efecto del atenolol en parámetros relacionados con el estrés oxidativo, el envejecimiento y la longevidad.	67
Modelo 1.1. Efecto agudo del atenolol en corazón de rata Wistar	67
Modelo 1.2. Efecto del atenolol en corazón y músculo de ratones B6D2F1 durante todo el ciclo vital.	68
2. Estudio de la interacción entre la restricción de metionina en la dieta y el tratamiento a medio plazo con atenolol en hígado de rata Wistar.	70
3. Estudio de la función mitocondrial y el estrés oxidativo en ratones ELOVL2 KO.	73
- MATERIALES	75
1. EQUIPO INSTRUMENTAL	75
2. PRODUCTOS QUÍMICOS	76
3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	78
- MÉTODOS ANALÍTICOS	79
1. Producción mitocondrial de ROS, consumo de oxígeno y fuga de radicales libres	79
1.1. Aislamiento de mitocondrias funcionales de:	
- Corazón y músculo esquelético	79
- Hígado	80
1.2. Valoración de proteína mitocondrial	82
1.3. Consumo de oxígeno mitocondrial	83
1.4. Producción mitocondrial de ROS	86
1.5. Fuga de radicales libres	88
2. Daño oxidativo al ADN mitocondrial	89
2.1. Aislamiento del ADN mitocondrial	89
2.2. Digestión del ADN mitocondrial	91
2.3. Condiciones cromatográficas	91

2.4. Cálculo de las concentraciones de dG y 8-oxodG	92
3. Daño oxidativo a proteínas	93
3.1. Preparación de las muestras	93
3.2. Síntesis de los estándares internos	93
3.3. Análisis de AASA, CEL, CML, MDAL y GSA	95
3.4. Cromatografía de gases / espectrometría de masas	96
4. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales	96
4.1. Extracción de lípidos	96
4.2. Condiciones cromatográficas	97
4.3. Cálculo de los índices relacionados con la composición lipídica	97
4.4. Estimación de actividades desaturasa y elongasa	99
5. Cantidad de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria así como de AIF, SIRT1 y 5, NRF-2, PCG-1 $\alpha$ , TFAM, MnSOD, ERK y p-ERK: análisis de western blot	100
6. Medidas de parámetros fisiológicos “in vivo”	101
6.1. Temperatura rectal	101
6.2. Tasa metabólica	101
6.3. Presión sanguínea y Frecuencia cardíaca	102
7. Estudios de comportamiento	102
7.1. Reflejo extensor del cuarto trasero	103
7.2. Prueba de la barra cilíndrica de madera	104
7.3. Prueba de la cuerda tirante	105
7.4. Prueba del campo abierto	106
7.5. Prueba del tablero de agujeros	107
7.6. Prueba del laberinto en T	108
8. Estudio de función inmunitaria	108
8.1. Obtención de suspensiones de leucocitos de bazo	108

8.2. Capacidad de movilidad inducida o quimiotaxis de los leucocitos	109
8.3. Capacidad proliferativa de los linfocitos	109
8.4. Estudio de la actividad citotóxica <i>Natural Killer</i> (NK)	110
9. Métodos estadísticos	110
9.1. Características muestrales	110
9.2. Análisis estadísticos	111
<b>RESULTADOS</b>	<b>113</b>
<b>ESTUDIO I. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ATENOLOL EN PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL ENVEJECIMIENTO</b>	<b>115</b>
Modelo 1.1. Efecto agudo del atenolol en corazón de rata Wistar	115
1.1.1. Peso de animales y órganos	115
1.1.2. Consumo de oxígeno mitocondrial	116
1.1.3. Producción mitocondrial de radicales libres	117
1.1.4. Fuga de radicales libres	118
1.1.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	119
1.1.6. Cantidad de AIF, MnSOD, SIRT3 y SIRT5	120
1.1.7. Daño oxidativo a proteínas	121
1.1.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial	122
1.1.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales	123
1.1.10. Estimación de las actividades desaturasa y elongasa	127
Modelo 1.2. Efecto del atenolol en corazón y músculo de ratón B6D2F1 durante todo el ciclo vital.	129
1.2.1. Peso de animales y órganos	129
1.2.2. Parámetros fisiológicos	130

1.2.2.1. Temperatura rectal	
1.2.2.2. Tasa metabólica	
1.2.2.3. Tensión sanguínea y Frecuencia cardíaca	
1.2.3. Consumo de oxígeno mitocondrial	131
1.2.4. Producción mitocondrial de radicales libres	133
1.2.5. Fuga de radicales libres	134
1.2.6. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	135
1.2.7. Cantidad de AIF, ERK y p-ERK.	137
1.2.8. Daño oxidativo a proteínas	138
1.2.9. Daño oxidativo al ADN mitocondrial	140
1.2.10. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales	141
1.2.11. Estimación de actividades desaturasa y elongasa	148
1.2.12. Estudios de comportamiento	151
1.2.13. Estudio de funciones inmunitarias	155
1.2.14. Presión sanguínea y Frecuencia cardíaca a edades avanzadas	156
1.2.15. Curvas de Supervivencia	157
<b>ESTUDIO II. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA Y EL TRATAMIENTO A MEDIO PLAZO CON ATENOLOL EN RATA WISTAR</b>	<b>159</b>
2.1. Peso de animales y órganos	159
2.2. Consumo de oxígeno mitocondrial	160
2.3. Producción mitocondrial de radicales libres	161
2.4. Fuga de radicales libres	163
2.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	164
2.6. Cantidad de AIF, ERK y p-ERK	165
2.7. Daño oxidativo a proteínas	167



2.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial	168
2.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales	168
2.10. Estimación de las actividades desaturasa y elongasa	171
<b>ESTUDIO III. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATONES ELOVL2KO</b>	<b>173</b>
3.1. Estudio de la función mitocondrial	173
3.2. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y mitoNEET	174
3.3. Daño oxidativo a proteínas	175
3.4. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales	176
3.5. Estimación de las actividades desaturasa y elongasa	180
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>183</b>
<b>CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS</b>	<b>223</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>229</b>
<b>RESUMEN GENERAL/ GENERAL SUMMARY</b>	<b>253</b>



# INTRODUCCIÓN



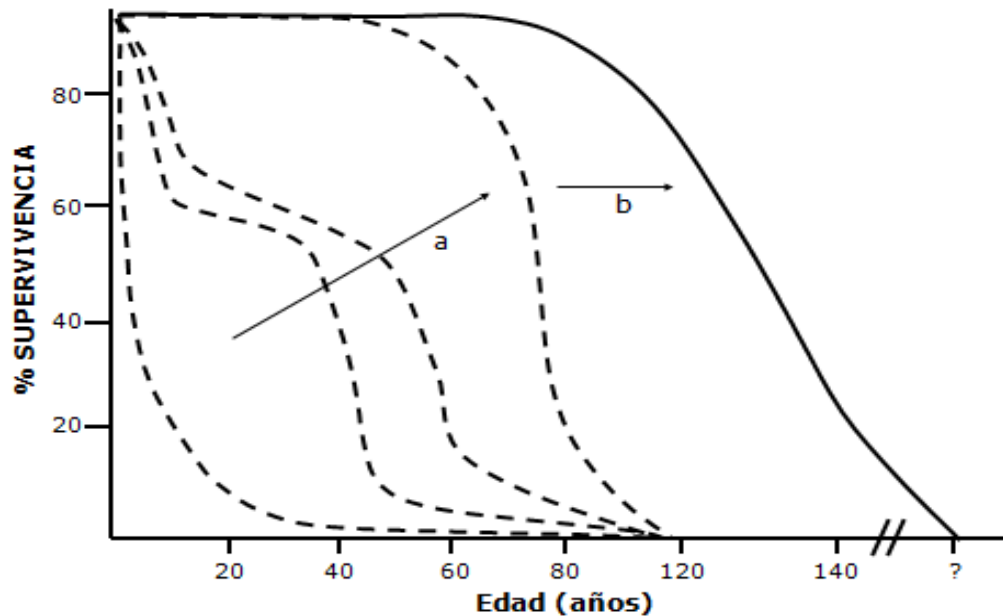
## 1. ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un fenómeno que ha inquietado al hombre desde el momento en que adquiere conciencia de su propia muerte. Así, a lo largo de la historia, han sido muchos los que ansiaban retrasar, o incluso evitar, este irremediable destino: desde los egipcios momificando a sus muertos con la esperanza de tener otra vida después de la muerte, pasando por numerosos rituales alquimistas en la edad media para prolongar la vida en este mundo, incluso la búsqueda de la fuente de la eterna juventud por diferentes exploradores (entre ellos Ponce de León en 1513) en los bosques de lo que hoy es Florida.

En la actualidad, quizá tengamos más asumido el hecho de morir, pero seguimos intentando retrasar el momento y mejorar las condiciones en las que pasamos los últimos años de nuestra vida. Esta segunda premisa ha sido posible gracias a los avances científicos en medicina y las mejoras en la calidad de vida, que ha permitido a un mayor número de personas alcanzar la vejez. Lo que por un lado es sin duda un gran avance, se ha convertido también en un problema para nuestra sociedad, ya que tenemos cada vez una población más envejecida y afectada por diferentes enfermedades asociadas al envejecimiento, lo que a su vez acarrea una serie de problemas socioeconómicos y de gestión sanitaria.

Por lo tanto, aunque pueda parecer que se ha conseguido retrasar el envejecimiento, debemos tener en cuenta que hasta ahora tan solo hemos podido incrementar la esperanza de vida o **longevidad media**, que se refiere al promedio de años que un individuo puede vivir por pertenecer a una población específica; pero la **longevidad máxima (MLSP, *maximum life span potential*)**, que correspondería a la edad máxima alcanzable por los individuos pertenecientes a una especie concreta, permanece inmutable (Figura 1). Dicho en otras palabras, un individuo puede llegar a vivir más años al estar en un ambiente favorable, aunque eso no significa que no siga envejeciendo igual que antes (ya sea un país desarrollado frente a uno subdesarrollado en el caso del hombre, o un ambiente sin depredadores y con abundancia de alimentos frente a un ambiente más hostil en el caso de otros animales), pero nunca llegará a vivir más años que la longevidad máxima que de su especie, determinada

genéticamente y característica para cada especie. Así una paloma no llegará a superar los 35 años ni un ratón los 4 años aun viviendo en las mejores condiciones posibles.



**Figura 1. Curva de supervivencia de diferentes poblaciones humanas durante la historia (- - -) y en el futuro ( — ).** El incremento de la longevidad media propiciado por el avance científico y la mejora de las condiciones de vida ha rectangularizado la curva de supervivencia (Flecha a). Sin embargo, la longevidad máxima no se ha modificado. En la actualidad, la ciencia persigue comprender los mecanismos que subyacen al envejecimiento para, actuando sobre ellos, lograr disminuir la tasa de envejecimiento e incrementar la longevidad máxima (Flecha b). Modificado de (Knight, 1995)

Para intentar aclarar estos dos conceptos de longevidad, definiremos otro más: la **tasa de envejecimiento**, que es la velocidad a la que se produce la acumulación de cambios deletéreos que provoca el envejecimiento. La disminución de la misma es el objetivo deseable y es necesaria para aumentar la longevidad máxima. Dicha tasa está determinada genéticamente y difiere entre especies.

El reto que se plantea la ciencia actualmente es intentar comprender e identificar los factores endógenos que causan el envejecimiento para poder actuar sobre ellos incrementando la longevidad máxima (a partir de ahora, longevidad) y

frenar así la aparición de enfermedades asociadas a la edad muy extendidas en nuestra sociedad, tales como cáncer, diabetes, Alzheimer o Parkinson.

### 1.1. Definición y características

Dentro ya de este contexto, podemos definir el envejecimiento como la **acumulación progresiva de cambios con el tiempo que reducen la capacidad del individuo para enfrentarse al estrés disminuyendo así sus posibilidades de supervivencia (Harman, 1986).**

Además, existen una serie de características descritas por el gerontólogo americano Bernard Strehler (Strehler, 1962) en las que nos podemos apoyar para lograr definir el envejecimiento de forma más precisa. Según Strehler, el envejecimiento es universal, endógeno, progresivo y deletéreo.

1. **Universal:** el envejecimiento se produce en todos los individuos de una especie.
2. **Endógeno:** las causas del envejecimiento tienen un origen interno, intrínseco a cada especie y está determinado por el genoma de la misma, no por el medio externo. Así existen diferentes especies con distintas longevidades máximas que viven en el mismo ambiente, y por el contrario los individuos de una misma especie no varían su longevidad máxima aunque vivan en ambientes diferentes.
3. **Progresivo:** lo que indica que las causas del envejecimiento están presentes en el individuo a lo largo de toda su vida, desde el momento de su nacimiento. No aparecen únicamente en la vejez o en la edad adulta.
4. **Deletéreo:** es perjudicial para el individuo, aunque posiblemente, no para la especie. Los daños producidos por el envejecimiento se ven más claros en los tejidos compuestos por células postmitóticas, como corazón y cerebro (Miquel et al., 1980), que en aquellos donde las células se dividen constantemente, como puede ser el caso de la piel o las mucosas.

## 1.2. Teorías del envejecimiento

Un fenómeno tan complejo y que ha suscitado tanto interés a lo largo de la historia de la humanidad, ha dado lugar también a numerosas teorías que intentan explicarlo desde diferentes puntos de vista. Existen revisiones, como la realizada por Medvedev en 1990 (Medvedev, 1990) o Yin y Chen en 2005 (Yin y Chen, 2005) , que enumeran y explican distintas teorías propuestas por diferentes campos de la biología e incluso de otras ciencias como las matemáticas. Cabe mencionar algunas de ellas para hacernos una idea de los diferentes puntos de vista desde los que se ha abordado el estudio del proceso de envejecimiento:

Nos encontramos teorías genéticamente programadas, que defienden la idea de que existe un programa inscrito en los genes que regula el envejecimiento como una etapa más del ciclo vital del individuo. Dentro de estas citaremos como ejemplos la teoría del límite de duplicación celular (Hayflick, 1965), que se basa en la existencia de un número fijo de divisiones celulares y la teoría telomérica (Olovnikov, 1971) que propone el acortamiento de los telómeros como causa del envejecimiento. Sin embargo, ninguna de estas dos teorías podría explicar el envejecimiento en tejidos postmitóticos, como corazón y cerebro, que se ven afectados especialmente en edades avanzadas. Por otro lado hay teorías de desarrollo, como la endocrina (Korenchevsky, 1961) y la inmuno-biológica (Waford, 1969). Un bloque importante lo constituyen las teorías estocásticas, o de envejecimiento por acumulación de daño. Dentro de este grupo podemos citar algunas teorías como la de mutaciones somáticas (Failla, 1958; Szilard, 1959), la del error catastrófico (Orgel, 1963), que se basa en errores durante la transcripción y traducción del ADN y el ARN. Estas mutaciones conducirían a proteínas erróneas, degeneración celular y finalmente la muerte. La teoría de la glicosilación proteica (Cerami, 1985), definida por el fenómeno de glicosilación de proteínas (Maillard, 1912) tras el cual las proteínas pueden sufrir daños fragmentándose y dando lugar a los llamados AGEs (del inglés *glycation end products*). Estos productos poseen una reactividad similar a la de los productos de la oxidación lipídica, pudiendo dañar proteínas estructurales y enzimas importantes para el funcionamiento del organismo. Entre todas estas teorías, la más aceptada por la comunidad científica, basada tanto en evidencias experimentales como en la observación de la naturaleza (biología



comparada), es la **Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres** (Harman, 1972), en la cual se basa la presente tesis doctoral y que será detallada en el siguiente punto.

### **1.3. Teoría mitocondrial de envejecimiento por radicales libres**

Aunque existen decenas de teorías que intentan explicar el proceso de envejecimiento, la teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres cuenta, desde su publicación por Denham Harman hace ya casi 6 décadas hasta la actualidad, con el máximo apoyo de la comunidad científica, siendo abalada por numerosas pruebas teóricas y experimentales que encajan con las cuatro reglas de Strehler.

Inicialmente, la teoría fue propuesta como la Teoría de Envejecimiento por Radicales Libres (Harman, 1956), que proponía como causa del envejecimiento la acumulación de daño por la acción de los radicales libres producidos durante el metabolismo celular. Esta teoría cobró fuerza cuando en 1969 se descubrió la enzima superóxido dismutasa (SOD) (McCord y Fridovich, 1969), capaz de eliminar el radical superóxido y detoxificar el daño oxidativo. Además, unos años más tarde, autores como Britton Chance (Chance et al., 1979) descubrió que durante la respiración mitocondrial normal, en mitocondrias aisladas, el oxígeno es incompletamente reducido produciéndose una fuga de electrones de la cadena de transporte electrónico que dan lugar a moléculas altamente reactivas e inestables llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species).

Estos nuevos descubrimientos llevaron a Harman a repostular su teoría señalando a la mitocondria como principal lugar de generación de radicales libres y principal diana de acción de los mismos (Harman, 1972). Aproximadamente durante los primeros 30 años de vida, la teoría estuvo centrada en los sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como no enzimáticos, tales como la catalasa, glutatión-peroxidasa y reductasa o el ascorbato. Fue en 1993 cuando se descubrió que los niveles de antioxidantes correlacionaban con la longevidad en vertebrados, pero sorprendentemente, esta correlación fue negativa (Sohal et al., 1990; Lopez-Torres et al., 1993; Perez-Campo et al., 1994; Halliwell, 2006; Koh et al., 2006). Este descubrimiento, respaldado por datos procedentes de diferentes laboratorios, fue

revisado cuatro años más tarde (Perez-Campo et al., 1998), llegando a la siguiente conclusión: a más longevidad, los niveles tisulares de antioxidantes endógenos son más bajos. Esto unido al fracaso de la suplementación con antioxidantes en la dieta o su sobreexpresión en animales transgénicos a la hora de incrementar la longevidad máxima [revisado en (Sanz et al., 2006a; Pamplona y Costantini, 2011)] descartó por completo una posible implicación de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento.

Aunque en ese momento el fracaso de los antioxidantes pudiera parecer una crisis para la teoría, en realidad ésta salió reforzada por un razonamiento sencillo: es más lógico pensar que los animales longevos tienen una tasa reducida de generación de daño y no necesitan aumentar la detoxificación del mismo. Es mucho más eficaz evolutivamente hablando, tener sistemas que generen poco daño que invertir energía en enmendarlo. Esta hipótesis fue confirmada en la década de los 90 por los Profesores Rahindar Sohal y Gustavo Barja. Mientras que el primero demostró una correlación negativa entre la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno y superóxido y la longevidad en mamíferos (Sohal et al., 1989), los experimentos del grupo del doctor Barja en Biología Comparada (aves frente a mamíferos) (Barja et al., 1994a) fueron decisivos para aclarar la relación entre la baja producción de ROS mitocondrial y las diferencias de longevidad entre las diferentes especies. En los estudios llevados a cabo en mamíferos, se cumplía la ley de “velocidad de vida” (*Rate of Living*) de Pearl (Pearl, 1928), que postula que a mayor tasa metabólica, menor es la longevidad del animal; por lo tanto la producción de ROS sería dependiente del consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>): a mayor VO<sub>2</sub> mayor sería la producción de ROS. Esta idea se descartó gracias a la comparación entre rata y paloma, que son animales con igual tamaño corporal y una tasa metabólica similar o incluso mayor en la paloma, sin embargo el ave disfruta de una longevidad máxima de 35 años frente a los 4 de la rata. La única diferencia que se detectó entre ambas especies fue una menor producción de ROS en las mitocondrias de paloma a pesar de su mayor consumo de oxígeno, lo que podría contribuir a explicar su alta longevidad (Barja et al., 1994a; Barja et al., 1994b; Herrero y Barja, 1997; Barja y Herrero, 1998; Herrero y Barja, 1998). Además en estos estudios se vio que la reducción en la producción de ROS no era solo menor por unidad

de tiempo, sino también por unidad de flujo (para el mismo oxígeno consumido), y así el profesor Barja definió el concepto de **Fuga de Radicales Libres (%FRL) como el porcentaje de electrones que “escapan” de la cadena de transporte reduciendo incompletamente el oxígeno**. Se comprobó que esta FRL era menor en varias aves longevas.

Un apoyo importante para la teoría fue el descubrimiento de que, al igual que la producción mitocondrial de ROS correlaciona negativamente con la longevidad máxima (Ku et al., 1993), **el daño oxidativo al ADN mitocondrial** también lo hace en mamíferos (Barja y Herrero, 2000) y en aves (Herrero y Barja, 1999). Así se puso de manifiesto una relación entre la producción de ROS y el daño al ADN mitocondrial (ADNmit), de manera que los ROS causarían daños (como roturas, mutaciones...) en el ADNmit, provocando progresivamente el envejecimiento del individuo.

Existe otro factor importante que correlaciona adecuadamente con la longevidad máxima y que encaja con esta teoría: **el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas**. Se ha comprobado experimentalmente que las especies longevas, tanto de aves como de mamíferos, presentan un menor grado de insaturación en los lípidos que componen sus membranas celulares y mitocondriales, reduciendo así su sensibilidad al daño causado por peroxidación lipídica (Pamplona et al., 1996b; Pamplona et al., 1998b; Pamplona et al., 1999a; Pamplona et al., 1999b; Pamplona et al., 2002c; Hulbert et al., 2007).

En resumen, la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres es la única teoría que actualmente puede explicar la distinta tasa de envejecimiento en las distintas especies de aves y mamíferos.

## **2. MITOCONDRIA Y RADICALES LIBRES**

### **2.1. Origen, morfología y biogénesis mitocondrial**

El origen de la mitocondria se explica a través de una antigua hipótesis, rescatada en los años 70 por la científica estadounidense Lynn Margulis como Teoría Endosimbiótica (Margulis, 1970). Según esta teoría, hace unos 1.500 millones de años una célula procariota capaz de obtener energía de los nutrientes orgánicos empleando

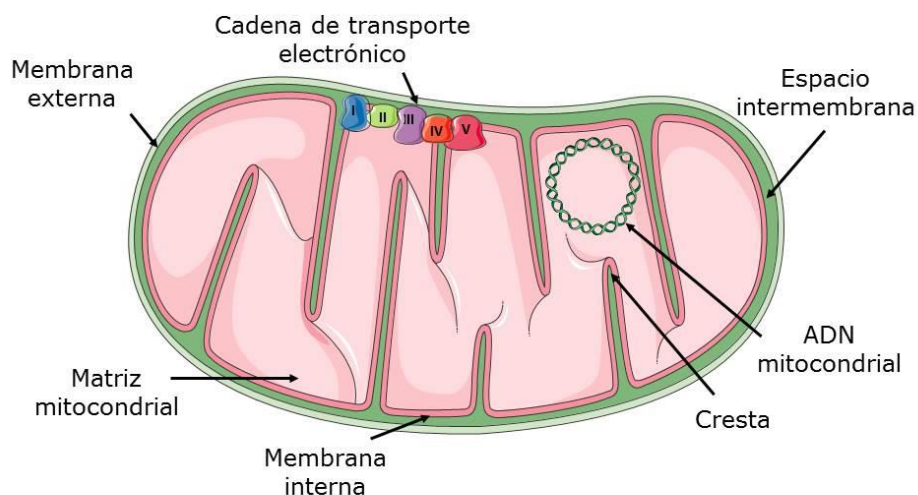
el oxígeno molecular como oxidante, se fusionó con otra célula procariota o eucariota primitiva (que ya poseía núcleo, cromosomas lineares...), mediante fagocitosis pero sin ser inmediatamente digerida. De este modo se produjo una simbiosis permanente, beneficiosa para los dos tipos de seres, ya que la célula procariota fagocitada proporcionaba energía en forma de ATP, mientras que la célula hospedadora aportaba un medio estable y rico en nutrientes. Así, la célula invasora llegaría a formar parte del organismo mayor, convirtiéndose en parte de él y dando lugar a la mitocondria.

La mitocondria es un orgánulo presente en la mayoría de las células eucariotas. En mamíferos se encuentra en todos los tipos celulares, siendo más abundantes en aquellas células con un mayor requerimiento energético, como en las células contráctiles de músculo y de corazón, o en los túbulos distales del riñón. Está rodeada por dos membranas muy diferentes entre sí. La membrana externa tiene un 60% de proteínas y un 40% de lípidos, es permeable al agua, iones y metabolitos como la sacarosa, gracias a que contiene unas proteínas llamadas porinas que forman poros de entrada para estas moléculas. La membrana interna contiene un 80% de proteínas y un 20% de lípidos. Debido a su alto contenido en cardiolipina, es impermeable a iones y metabolitos, sobre todo para aquellos que contienen carga, por ello tienen que atravesarla a través de sistemas de transporte intermembrana. Además se pliega formando las llamadas crestas mitocondriales, que sirven para aumentar la superficie y facilitar las numerosas reacciones enzimáticas que se llevan a cabo (Rich y Marechal, 2010). En la membrana interna se encuentra un gran número de proteínas. Además de las implicadas en el transporte de moléculas, están los sistemas dedicados al transporte electrónico y otras encargadas de acoplar ese transporte con la síntesis de ATP (como se desarrollará en el punto 2.3.). Así se crean dos compartimentos delimitados por esta doble membrana: la matriz, rodeada por la membrana mitocondrial interna, y el espacio intermembrana, embebido entre ambas membranas (Figura 2).

Las mitocondrias son los únicos orgánulos que poseen su propio ADN, lo que apoya su origen bacteriano. El ADN mitocondrial es una molécula de ADN circular de doble cadena compuesto por dos hebras (cadena pesada y cadena ligera), y en mamíferos codifica para 13 proteínas que forman parte de la cadena respiratoria, dos

ARNs ribosómicos (12s, 16s) y 22 ARNs de transferencia, necesarios para la traducción del ADN mitocondrial (Anderson et al., 1981). El ADN mitocondrial es sumamente frágil, debido a la falta de protección por carecer de histonas y a su localización cercana a los generadores de ROS en la cadena respiratoria.

La biogénesis mitocondrial es un proceso muy complejo, regulado por numerosos factores y esencial para el mantenimiento de la producción energética, la prevención del estrés oxidativo endógeno y la ayuda para lograr un envejecimiento saludable (Lopez-Lluch et al., 2008; Hock y Kralli, 2009). Dicho proceso requiere la translocación de proteínas a través de la membrana externa, por la proteína transportadora TOM40 (*Translocate of the Outer mitochondrial Membrane*), además del ensamblado de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, división, fusión y fisión mitocondrial. Todo ello requiere una perfecta coordinación de la expresión de dos genomas: el nuclear y el mitocondrial (Hunte et al., 2010).



**Figura 2. Morfología mitocondrial.** Esquema de los compartimentos mitocondriales: matriz (con enzimas y sustratos para las diferentes reacciones que se producen y el ADN mitocondrial), membrana mitocondrial interna (con diferentes transportadores y los complejos que forman la cadena de transporte electrónico), membrana mitocondrial externa y espacio intermembrana.

## 2.2. Radicales libres: principales tipos

Un radical libre es un átomo, molécula o compuesto con uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Esto hace que sean altamente electrófilos y capaces de atacar sitios de alta densidad o inestabilidad electrónica, como los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados o los átomos de nitrógeno del ADN, ARN y proteínas, modificando así su estructura y funcionalidad.

Las especies reactivas del oxígeno se denominan generalmente **ROS** (*Reactive Oxygen Species*), término colectivo que incluye a los derivados del oxígeno, tanto radicales como no-radicales, que son agentes oxidantes y/o son convertidos fácilmente en radicales (Halliwell, 2006). Los ROS son generados de manera natural durante procesos metabólicos en todos los seres aerobios; los lugares donde se generan son numerosos, aunque cuatro de ellos han atraído especial atención: la cadena respiratoria mitocondrial, el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos, reacciones del citocromo P-450 y células fagocíticas (Halliwell y Gutteridge, 1984). En la cadena respiratoria mitocondrial, los electrones se transportan uno a uno preferentemente, lo que da lugar a la fuga de los mismos (Muller, 2000) y a la producción de los diferentes tipos de radicales mediante la vía univalente de reducción del oxígeno (Figura 3) (Boveris y Chance, 1973).

El oxígeno diatómico es un radical por sí mismo, ya que tiene dos electrones desapareados localizados en orbitales diferentes, pero estos electrones tienen espines paralelos, por ello su reactividad es muy baja. Sin embargo, cuando se invierte la posición de estos espines, surge el oxígeno en estado **singlete** ( $O_2^*$ ), mucho más reactivo.

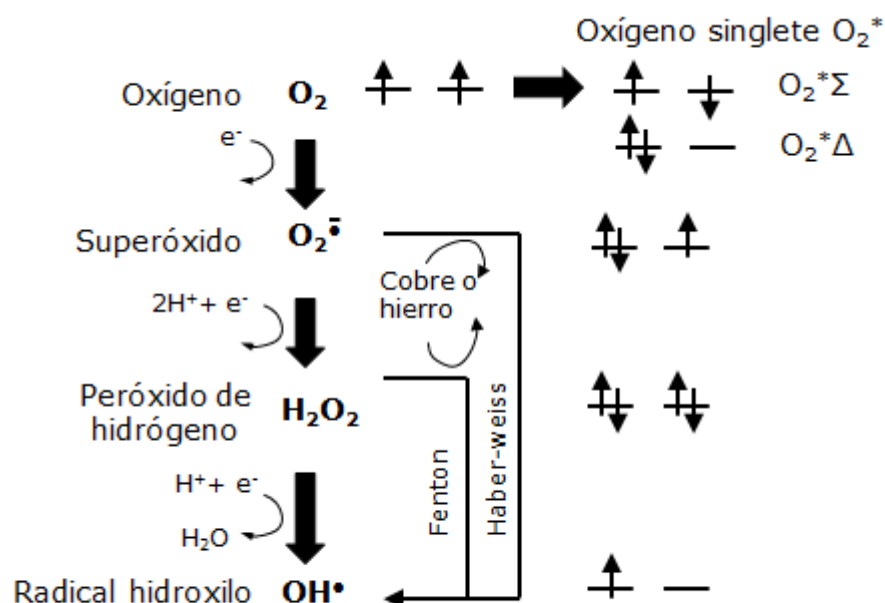
Cuando entra un nuevo electrón a una molécula de oxígeno, forma un par con el electrón que había en uno de los orbitales, quedando el otro desapareado y formándose así el radical **superóxido** ( $O_2^{\cdot-}$ ). Aunque no presenta reactividad suficiente para atacar macromoléculas de forma directa, es capaz de atacar a los centros hierro-sulfurados de los complejos I y II (Raha y Robinson, 2000) y dar lugar a radicales hidroxilo en combinación con el  $H_2O_2$  por la reacción de Haber-Weiss.

Cuando el oxígeno recibe dos electrones, se forma el radical peróxido, que es un ácido débil y es protonado a **peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**. No es realmente un radical libre, sino una molécula estable y poco reactiva, sin embargo tiene gran capacidad de difusión por lo que puede dar lugar a la producción de otros radicales en diferentes lugares de la célula a través de las reacciones de Haber-Weiss o Fenton, en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre.

Si se añade un electrón adicional al peróxido de hidrógeno se produce el **radical hidroxilo ( $\text{OH}\bullet$ )** gracias a la reducción de un ion metálico como el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por la reacción de Fenton. Este radical hidroxilo también se puede formar a partir del radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) en presencia de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la reacción de Haber-Weiss (Figura 3) (Halliwell y Gutteridge, 1984). Es altamente reactivo y su electrón desapareado puede reaccionar con cualquier tipo de molécula. Esa alta reactividad le impide difundir a través de las membranas, por lo que son el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  los encargados de difundir y formar  $\text{OH}\bullet$  en las distintas fracciones celulares.

Cuando se producen en exceso, los ROS dan lugar a daño principalmente de dos formas: a) por modificación directa de macromoléculas celulares o extracelulares, como las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos (como se detallará en el apartado 4. de esta introducción); b) por alteraciones en el estado redox de factores implicados en la transducción de señales, dando lugar a una mayor o menor regulación de algunas rutas de señalización, lo que alteraría su acción fisiológica (Lenaz, 2012a).

Además de las especies reactivas del oxígeno, cabe destacar otros radicales derivados de otros átomos como el nitrógeno (RNS), que forma principalmente el óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), un radical no demasiado reactivo pero con un papel importante en la señalización molecular (Rubio y Morales-Segura, 2004) a partir del cual se forman otras especies como el anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ).



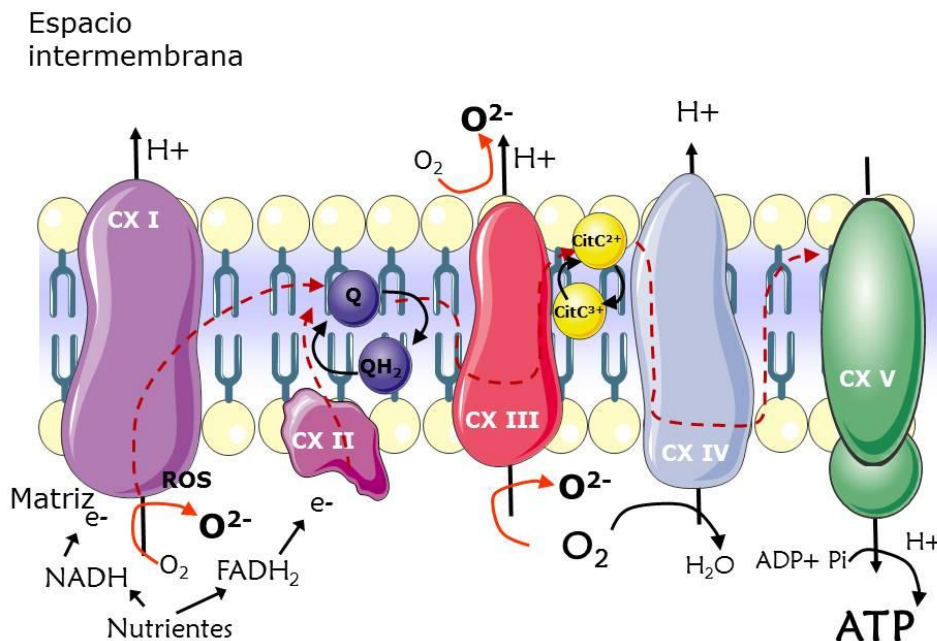
**Figura 3. Formación de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) mediante la vía univalente de reducción del oxígeno.** El radical superóxido se genera cuando el oxígeno recibe un electrón, el peróxido de hidrógeno cuando recibe dos y el radical hidroxilo cuando recibe tres electrones. Además, el oxígeno molecular puede sufrir una redistribución de los electrones situados en sus orbitales más externos, alcanzando un nuevo estado más reactivo conocido como oxígeno en estado singlete que puede existir en dos formas ( $\Sigma$  y  $\Delta$ ) (Halliwell y Gutteridge, 1984).

### 2.3. Cadena de transporte de electrones mitocondrial

Las mitocondrias son las encargadas de producir energía en la célula eucariota. Para ello, utilizan equivalentes metabólicos ( $NADH$  y  $FADH_2$ ) producidos en el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos o el catabolismo de aminoácidos, que son utilizados como sustratos por diferentes componentes de la cadena respiratoria mitocondrial en la membrana mitocondrial interna (Figura 4) (Lenaz, 2012a). Dicha cadena está formada principalmente por cuatro complejos con varias subunidades (I, II, III y IV), dos transportadores electrónicos (coenzima Q y citocromo c) y el complejo V o  $F_0-F_1$  ATPasa (Figura 4) (Lenaz y Genova, 2010). Los complejos I, III y IV de la cadena conducen los electrones a través de una serie de reacciones redox que permiten reducir el oxígeno molecular a agua. En este proceso de transferencia electrónica, se genera una energía que se utiliza para bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana, creando así un gradiente electroquímico utilizado por el complejo V para producir ATP (Drose y Brandt, 2012). Este transporte de electrones conlleva fugas



de los mismos que pueden reducir incompletamente el oxígeno molecular formando radicales libres (Muller, 2000), siendo los complejos I y III de la cadena los principales responsables de la producción de ROS.

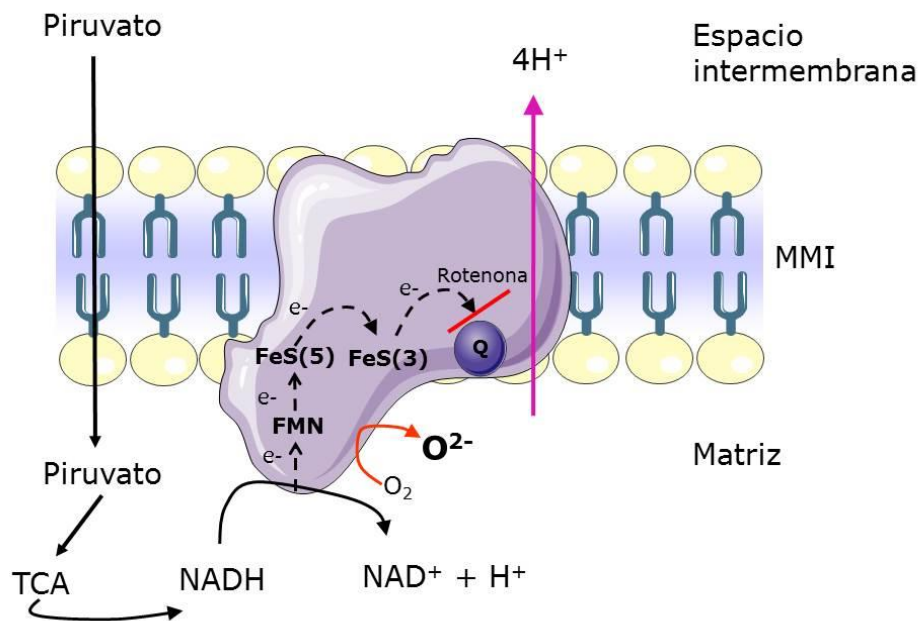


**Figura 4. Esquema de la cadena de transporte electrónico.** Está compuesta por cuatro complejos: I, II, III y IV (respectivamente, NADH deshidrogenasa, Succinato deshidrogenasa, Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa y Citocromo c oxidasa), dos transportadores electrónicos: Coenzima Q que transporta electrones desde el complejo I y II al III y Citocromo c, que los transporta del complejo III al IV, donde los electrones se combinan con el oxígeno para formar agua. La energía liberada por el transporte de electrones se usa para conducir el flujo de protones y establecer el gradiente de pH que posibilita la generación de ATP por el complejo V (ATP sintasa). Los complejos I y III han sido descritos como generadores de ROS. Cx: Complejo respiratorio; Q: Coenzima Q; QH<sub>2</sub>: ubiquinol; CitC: Citocromo C.

**Complejo I o NADH deshidrogenasa:** es el complejo multiproteico más grande de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En mamíferos, presenta un peso molecular de alrededor de 1.000 kDa y consta de 45 subunidades diferentes (Yagi y Matsuno-Yagi, 2003; Carroll et al., 2006), de las cuales 7 están codificadas por ADN mitocondrial. Presenta forma de L, encontrándose el brazo más corto (dominio hidrofílico) en la matriz mitocondrial y el brazo largo (dominio hidrofóbico) embebido en la membrana mitocondrial interna (Clason et al., 2010). En el brazo corto nos encontramos con dos módulos: el módulo N, que contiene el centro de unión al NADH y el centro activo de la enzima, constituido por un flavin mononucleótido (FMN) y 5

centros hierro-sulfurados. En el módulo Q nos encontramos 3 centros hierro-sulfurados que se encadenan con los anteriores y la coenzima Q. En el brazo largo tenemos la maquinaria encargada de bombear protones al espacio intermembrana (Droese y Brandt, 2012) (Figura 5). El complejo I es capaz de bombear 4 protones por cada dos electrones transferidos desde el NADH vía flavina (FMN) por medio de 7 de los centros hierro-sulfurados (FeS) organizados en cadena (Galkin et al., 2006). El último de los ocho centros hierro-sulfurados, presenta un residuo de tirosina terminal que sirve de unión con la coenzima Q y es esencial para la actividad enzimática (Hunte et al., 2010). Existen varios inhibidores que pueden bloquear el flujo de electrones a través de los diferentes transportadores del complejo. Así, la rotenona, actúa bloqueando la transferencia de electrones desde los centros Fe-S hasta la coenzima Q, actuando probablemente como análogo de la misma (Fato et al., 2009).

Actualmente existe una cierta controversia acerca de que molécula dentro del complejo actúa como reductor directo del oxígeno produciendo ROS. Entre los candidatos se encuentran la flavina (FMN), la semiquinona y el centro hierro-sulfurado N2, que es el donador directo de electrones a la coenzima Q (Lenaz et al., 2006). Cuando se aísla el complejo I, el principal productor de superóxido sería la flavina (Galkin y Brandt, 2005; Esterhazy et al., 2008), mientras que en membranas mitocondriales aisladas parece predominante la producción de ROS por el último centro hierro-sulfurado de la cadena (N2)(Fato et al., 2009). También cabe la posibilidad de que ambos generadores de ROS coexistan en el complejo I, lo que explicaría la generación de ROS durante el flujo reverso de electrones y la acción opuesta de dos inhibidores que actúan por debajo de los centros hierro-sulfurados (la rotenona, que incrementa la producción de ROS y la estigmatelina, que la inhibe) (Hirst et al., 2008; Fato et al., 2009; Lenaz, 2012a).



**Figura 5. Esquema del complejo I.** Está formado por 3 dominios: un dominio deshidrogenasa, donde el NADH es oxidado y contiene una flavina (FMN) y 5 centros hierro-sulfurados (FeS); un dominio hidrogenasa, donde la coenzima Q (Q) es reducida, que contiene 3 centros hierro-sulfurados (FeS) y un dominio transportador implicado en el bombeo de protones (Lenaz, 2012a) embebido en la membrana interna mitocondrial (MMI). La formación de superóxido podría ocurrir tanto en la flavina (FMN) como en algunos centros hierro sulfurados o en la semiquinona y es liberado a la matriz mitocondrial. (Modificado de Droese y Brandt, 2012).

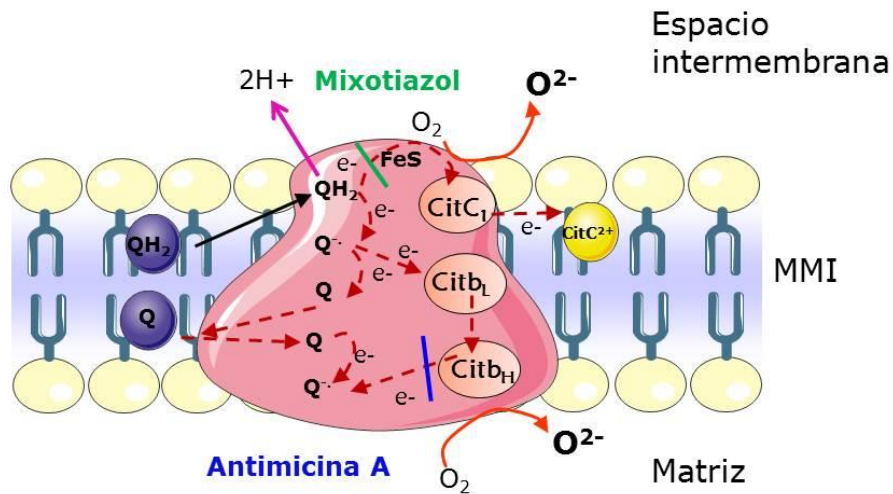
**Complejo II o Succinato Deshidrogenasa:** esta enzima es también un componente del ciclo de Krebs, y cataliza la reducción de la coenzima Q por medio de la conversión de succinato en fumarato. Está codificada exclusivamente por el genoma nuclear. Consta de un dominio anclado a la membrana por dos subunidades hidrofóbicas; y otro dominio soluble que contiene una flavoproteína que se une covalentemente al FAD además de un centro hierro sulfurado (lo que constituye la enzima succinato deshidrogenasa) (Cecchini, 2003). Los electrones se transfieren desde el succinato al FAD, reduciéndolo a FADH<sub>2</sub>, quien a su vez transfiere los electrones a la coenzima Q. Una de las moléculas que pueden inhibirlo es la tenoiltrifluoracetona (TTFA) mediante interacciones débiles con el último de los centros hierro-sulfurados que forman parte del complejo (Tyler, 1992).

**Coenzima Q:** es una quinona soluble en lípidos, por ello difunde lateralmente en la membrana mitocondrial interna interviniendo en el transporte electrónico entre los

componentes de la cadena respiratoria (Hinchliffe y Sazanov, 2005). Existen tres isoformas diferentes de esta quinona: ubiquinona o coenzima Q, semiquinona o coenzima  $Q^{\bullet-}$  y ubiquinol o coenzima  $QH_2$ . En la membrana mitocondrial interna nos la encontramos como una mezcla de ubiquinona-ubiquinol que transporta electrones desde los complejos I y II al complejo III. La semiquinona es uno de los componentes de la cadena de transporte electrónico más propensos a ceder su electrón desapareado al oxígeno generando así radicales superóxido, y está presente de forma transitoria cuando se encuentra formando parte de los complejos I y III (Mitchell, 1975), especialmente en este último durante el ciclo Q (Brandt, 1997).

**Complejo III o Ubiquinol-Citocromo c reductasa:** este complejo, de aproximadamente 240 kDa, está formado por 11 subunidades, cuatro grupos prostéticos: cit  $b_L$ , cit  $b_H$ , cit  $c_1$  y un centro hierro-sulfurado denominado proteína Rieske. Todos ellos están evolutivamente conservados tanto en procariotas como en eucariotas y constituyen el core funcional del complejo que forma parte de todas las reacciones redox que tienen lugar en el complejo III (Berry et al., 2000). Todos sus elementos están codificados por el genoma nuclear, excepto el citocromo b, que lo está por el mitocondrial (Zara et al., 2009). El complejo III cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol ( $CoQH_2$ ) al citocromo c en la superficie externa de la membrana, mediante el ciclo Q, mecanismo por el cual se bombean protones gracias a la presencia de distintas formas de ubiquinona (Figura 6) (Mitchell, 1975; Crofts, 2004).

Se ha demostrado que el anión superóxido se forma en el centro de oxidación del ubiquinol al complejo formado por el citocromo b- citocromo  $c_1$  (Boveris et al., 1976; Cadenas et al., 1977). Entre los inhibidores que pueden bloquear el transporte electrónico en el complejo III se encuentran el mixotiazol, que interrumpe el flujo desde el ubiquinol hasta el centro Rieske y la antimicina A que bloquea el flujo desde el citocromo  $b_H$  ó b-560 hasta la coenzima Q (Turrens et al., 1985).



**Figura 6. Ciclo Q en el Complejo III.** El ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ) cede dos electrones, uno al citocromo  $\text{c}_1$ , por medio del centro hierro-sulfurado Rieske, y finalmente al citocromo  $\text{c}$  presente en la membrana. El segundo electrón es cedido al citocromo  $\text{b}_\text{L}$  (también denominado citocromo  $\text{b-566}$ ), liberando los protones al espacio intermembrana durante el proceso y formándose el anión semiquinona, inestable, que es inmediatamente oxidado a ubiquinona ( $\text{Q}$ ) por el citocromo  $\text{b}_\text{H}$  (o  $\text{b-560}$ ). Tras ello, la ubiquinona es reoxidada a semiquinona. El ciclo se completa con la oxidación de una segunda molécula de  $\text{QH}_2$ . Dos de los inhibidores mejor caracterizados son la antimicina A (en azul) y el mixotiazol (en verde). (Modificado de Lenaz, 2012a).

**Complejo IV o Citocromo c oxidasa:** en mamíferos se presenta en forma de dímero, con un peso molecular de alrededor de 200 kDa (Tsukihara et al., 1996). Presenta tres subunidades conservadas (I, II, III) codificadas por el genoma mitocondrial, y diez adicionales codificadas por ADN del núcleo. Este complejo es el encargado de ceder los electrones al oxígeno molecular y generar agua. El transporte electrónico se realiza por medio de cuatro centros redox: dos centros cúpricos ( $\text{Cu}_\text{A}$  y  $\text{Cu}_\text{B}$ ) y dos grupos hemo ( $\text{a}$  y  $\text{a}_3$ ) (Tyler, 1992). El citocromo  $\text{c}$  cede los electrones al centro  $\text{Cu}_\text{A}$ , que a su vez los transfiere al grupo hemo  $\text{a}$ . Este grupo hemo traspasa los electrones a el centro binuclear hemo  $\text{a}_3/\text{Cu}_\text{B}$  que será el encargado de donarlos al oxígeno molecular. Este transporte electrónico genera un bombeo de protones desde

la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (Rich y Marechal, 2010; Papa et al., 2012).

El complejo IV tiene una alta afinidad por el oxígeno, por lo que es capaz de funcionar en condiciones de baja presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ). Además, se cree que la citocromo c oxidasa es la responsable de más del 90 % del consumo de oxígeno en los animales aerobios.

**Complejo V o  $F_1F_0$ ATP sintasa:** está compuesto por 16 subunidades, dos de ellas codificadas por ADN mitocondrial y el resto por ADN del núcleo, y tiene un peso molecular de 550 kDa. Se divide en dos dominios: una porción globular más grande, que es la parte catalítica del complejo (sector  $F_1$ ), con 5 subunidades y situada en la matriz mitocondrial; y otra porción embebida en la membrana (sector  $F_0$ ), con un número variable de subunidades, dependiendo de la especie, a través de la cual se produce la translocación de protones necesaria para la síntesis de ATP (Papa et al., 2012).

Recientemente, se ha abierto un nuevo campo de investigación en torno a la organización supramolecular de los complejos de la cadena respiratoria en “supercomplejos” (Lenaz y Génova 2012). Esta idea comenzó a tomar fuerza tras el aislamiento del supercomplejo formado por la asociación de los complejos I, III y IV, que aparecía con distinta configuración y estequiometría en mitocondrias procedentes de diferentes organismos (Schagger y Pfeiffer, 2000; Schagger y Pfeiffer, 2001). Debido a la variación de asociaciones observadas, se le denominó “respirasoma”, considerándolo la unidad menor para llevar a cabo la respiración completa desde NADH hasta oxígeno. El salto de esta visión meramente estructural a una aproximación funcional de los supercomplejos se llevó a cabo por primera vez en la bacteria *P. denitrificans* (Stroh et al., 2004) y más adelante en mitocondrias de mamíferos, demostrando la presencia de actividad NADH oxidasa con un electrodo tipo Clark (Acin-Perez et al., 2008). Este hecho puso de manifiesto que los supercomplejos no eran solo una entidad estructural, sino que son competentes en la respiración y que podrían jugar un papel importante en la transferencia de electrones. Aunque queda mucho por investigar sobre su función, recientemente se ha demostrado que la

pérdida de la estructura en supercomplejos, conduce a una mayor producción de ROS por parte del complejo I (Maranzana et al., 2013), lo que a su vez podría intervenir en la modulación de diferentes rutas de señalización celular. También se ha visto que los supercomplejos juegan un papel importante en adaptaciones metabólicas que conducirían a generar más NADH o FADH<sub>2</sub> en la cadena respiratoria en función de la disponibilidad de sustratos, por ejemplo la mayor presencia de ácidos grasos en periodos de ayuno (revisado en Genova y Lenaz, 2013; Lapuente-Brun et al., 2013).

#### **2.4. Producción de ROS en la mitocondria y su relación con el envejecimiento**

La generación de radicales libres en la mitocondria se produce cuando alguno de los transportadores de la cadena respiratoria cede algún electrón al oxígeno molecular, lo que **depende de la accesibilidad del oxígeno molecular y de la tendencia del transportador a donarlos, que viene determinada por el potencial redox (Speakman, 2003)**. Los valores positivos en el potencial redox indican una tendencia oxidante, mientras que los valores negativos indican una tendencia reductora (Muller, 2000). Así, a menor valor del potencial redox, mayor será la tendencia de la molécula a ceder electrones. Por lo tanto para que se produzca la generación del radical superóxido a partir del oxígeno molecular es necesario que el donante de electrones tenga un potencial redox menor que la pareja  $O_2/O_2^{\cdot-}$ , que se sitúa en torno a -0,14 V. Los complejos II y IV, con mayores valores del potencial redox, quedan descartados como generadores de superóxido, lo que además ha sido confirmado en diferentes estudios con mitocondrias funcionales (Chance et al., 1979; Herrero y Barja, 1998). Teniendo en cuenta los potenciales redox así como diversos estudios donde se ha investigado la producción de ROS en mitocondrias aisladas, se ha sugerido que son el **complejo I** (Herrero y Barja, 2000; Kudin et al., 2005; Muller et al., 2008) y el **complejo III** (Boveris et al., 1976; Barja, 1999; Muller et al., 2008) **los principales productores de radicales libres en la mitocondria**.

**El complejo I genera el radical superóxido hacia la matriz mitocondrial** durante la transferencia electrónica directa (cuando los electrones son cedidos por el NADH) y reversa (cuando se produce un flujo reverso desde el complejo II al complejo I por medio de la ubiquinona) lo que requiere un potencial de membrana alto (Votyakova y

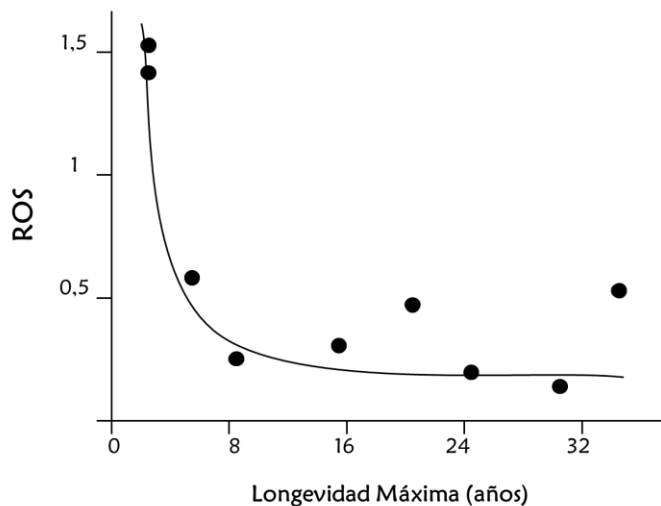
Reynolds, 2001; Murphy, 2009; Droese y Brandt, 2012). Teniendo en cuenta que la liberación del radical superóxido en el complejo I se produce hacia la matriz mitocondrial, es lógico pensar que puede suponer un daño importante para el ADN mitocondrial, debido a su localización en la misma muy próximo a la membrana interna (Costa et al., 2011), además de para los lípidos de membrana y las proteínas mitocondriales (como se detallará en el apartado 4 de esta introducción). Por ello, entre otras razones, **el complejo I parece ser el complejo mitocondrial determinante en el caso del envejecimiento**. Esta suposición se ve avalada por numerosos datos experimentales, ya que tanto en las especies longevas de aves y mamíferos como en los animales sometidos a restricción dietética (la manipulación experimental mejor conocida capaz de incrementar la longevidad máxima) se ha detectado que el descenso de producción de ROS mitocondrial ocurre en el complejo I (Figura 7) (Gredilla y Barja, 2005; Pamplona y Barja, 2011) acompañado de un menor daño al ADN mitocondrial (Barja y Herrero, 2000; Gredilla et al., 2001a; Gredilla et al., 2001b). Esta idea se ve reforzada por el hecho de que la magnitud del descenso en el daño oxidativo al ADN mitocondrial suele coincidir con la magnitud del descenso en la producción de ROS (revisado en Gredilla y Barja, 2005).

Otra razón por la que el complejo I es el candidato para controlar la producción de ROS durante el proceso de envejecimiento, es que 7 (ND1-ND6) de las 46 subunidades que forman este complejo están codificadas por el ADN mitocondrial, en concreto 7 de las 14 subunidades (el 50%) que conforman el núcleo básico para catalizar la oxidación del NADH y para formar el cuerpo hidrofóbico de anclaje a la membrana (Koopman et al., 2010). De este modo, si el ADN mitocondrial se ve modificado y estas subunidades no se expresan, el complejo I no sería funcional (James y Murphy, 2002). Cabría pensar que si el complejo I determina de manera tan directa el daño que sufre el ADN mitocondrial, los mecanismos evolutivos encaminados a incrementar la longevidad disminuyendo la producción de ROS, estarían centrados en el complejo I.

Además, a pesar de que se han llevado a cabo estudios con mutaciones que afectan a los distintos complejos de la cadena respiratoria, el único efecto positivo sobre la longevidad en animales ha sido demostrado tras la manipulación del complejo



I y su sustitución por la enzima Ndi1 (NADH deshidrogenasa interna 1) en *Drosophila melanogaster* (Sanz et al., 2010).



**Figura 7: Relación entre la longevidad máxima (MLSP) y la producción mitocondrial de ROS en 8 especies de mamíferos y 3 de aves** (Ku et al., 1993; Barja et al., 1994a). Las especies de mamíferos utilizadas fueron, de menor a mayor longevidad: Ratón (*Mus musculus*, MLSP = 4 años), Rata (*Rattus norvegicus*, MLSP = 5 años), Cobaya (*Cavia porcelus*, MLSP = 12 años), Conejo (*Oryctolagus cuniculus*, MLSP = 13 años), Periquito (*Melopsittacus undulatus*, MLSP = 21 años), Canario (*Serinus canaria*, MLSP = 24 años), Oveja (*Ovis aries*, MLSP = 19 años), Cerdo (*Sus scrofa*, MLSP = 21 años), Paloma (*Columba livia*, MLSP = 35 años) y Vaca (*Bos taurus*, MLSP = 49 años)

En cuanto al complejo III, **algunos estudios indican que dirige toda la producción de ROS al espacio intermembrana** (St-Pierre et al., 2002; Kudin et al., 2004) **mientras que otros trabajos sugieren que aproximadamente la mitad de los radicales se generan hacia el espacio intermembrana y la otra mitad hacia la matriz mitocondrial** (Muller et al., 2004). Por ello, entre otras razones, y a pesar de que el complejo III es un importante generador de radicales libres, **su importancia fisiológica en la producción de ROS es limitada**, y el complejo I se convierte en el productor de radicales libres fundamental en el proceso de envejecimiento (Hirst et al., 2008).

## 2.5. Regulación de la producción de ROS en la cadena respiratoria

La producción mitocondrial de ROS depende principalmente de dos factores: el grado de reducción electrónica de los generadores de ROS y la presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) local (Barja, 2007). **El grado de reducción electrónica** determina la capacidad de los complejos de donar electrones al oxígeno, de tal forma que a mayor grado de reducción electrónica, mayor producción de ROS. Cuando el flujo electrónico es lento, los electrones tienden a acumularse en la cadena respiratoria y los complejos tienden a reducirse más en estado de reposo, y por lo tanto a generar más ROS (esto correspondería con el estado 4 cuando las mitocondrias no producen ATP la tasa de consumo de oxígeno es más baja). Sin embargo, en presencia de ADP (estado 3), el flujo electrónico se incrementa, los electrones fluyen rápidamente y el grado de reducción de los generadores de ROS desciende produciendo menor cantidad de radicales libres (Loschen et al., 1971; Kushnareva et al., 2002).

El otro mecanismo que ayuda a disminuir la producción de ROS cuando se incrementa la respiración mitocondrial es el descenso de la  **$pO_2$  local** debido al mayor consumo de oxígeno mitocondrial. La constante de afinidad ( $K_m$ ) del complejo IV para el oxígeno es muy baja (alta afinidad), para poder asegurar la fosforilación oxidativa continua aunque la  $pO_2$  sea baja. Sin embargo, la  $K_m$  para el  $O_2$  de los generadores de ROS es mucho mayor y se sitúa dentro del rango fisiológico de la  $pO_2$  de los tejidos *in vivo*. Por lo tanto, la generación de ROS mitocondrial es dependiente de la  $pO_2$  a  $pO_2$  fisiológica (Boveris y Chance, 1973; Barja, 2007; Hoffman et al., 2007). Esta  $pO_2$  específica de cada tejido varía entre especies, disminuyendo a medida que aumenta su talla corporal (Schmidt-Neilsen K., 1958), lo que correlaciona con una menor producción de ROS y una mayor longevidad (Lambert et al., 2007). Todo esto apoya la idea de que la producción de ROS está condicionada por la  $pO_2$  específica de tejido, y ambas condicionan la tasa de envejecimiento intrínseca en cada especie.

Además de estos existen otros mecanismos fisiológicos capaces de modular la producción mitocondrial de ROS (Barja, 2007; Pamplona y Barja, 2011), como por ejemplo:

- **La cantidad de los complejos respiratorios mitocondriales:** al disminuir la cantidad de los mismos disminuye también la producción mitocondrial de ROS (Turrens, 2003; Lambert et al., 2010).
- **Modificaciones post-traduccionales de los complejos respiratorios:** por fosforilación, glutatiónización y nitración. Se ha descrito un incremento en la producción de ROS tras las dos primeras (Raha et al., 2002; Taylor et al., 2003), mientras que la nitración se relaciona más con situaciones patológicas (Murray et al., 2003), como en el caso de la isquemia de miocardio, donde la nitración de la cisteína 39 del CI produce un descenso de la producción de ROS durante el proceso de reperfusión (Chouchani et al., 2013).
- **La acción de las proteínas desacoplantes:** la producción del anión superóxido es muy sensible a la fuerza protón motriz, de manera que su producción puede reducirse mediante el desacoplamiento débil de la fosforilación oxidativa por medio de las proteínas desacoplantes UCP1, UCP2 y UCP3 (Brand et al., 2004; Azzu et al., 2010).

### 3. LÍPIDOS

#### 3.1. Importancia fisiológica

Los lípidos son moléculas insolubles en agua, con estructuras diversas, lo que les confiere diferentes propiedades biológicas. Así, los ácidos grasos y triacilglicerol son fundamentales en el almacenamiento energético; los fosfolípidos y los esteroides forman parte estructural de las membranas biológicas; y otros lípidos, aunque se encuentren en cantidades pequeñas, desempeñan un papel importante como cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, pigmentos, en el anclaje de proteínas a las membranas y en el plegamiento de las mismas (chaperonas), como agentes emulsionantes en el tracto digestivo, hormonas y mensajeros intracelulares.

#### 3.2. Metabolismo lipídico

Los ácidos grasos son componentes esenciales de todas las membranas biológicas y a su vez representan una importante reserva de energía tanto para

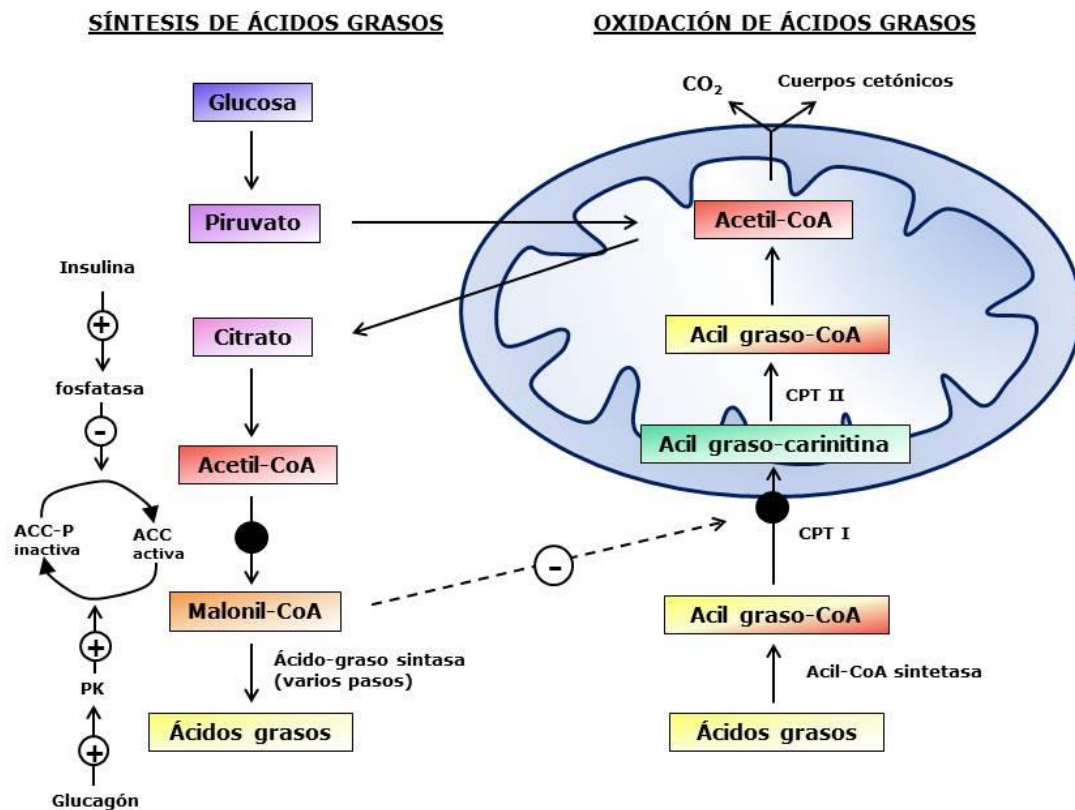
animales como para plantas, por ello sus rutas de biosíntesis ocurren de forma universal en todos los organismos vivos (Smith, 1994). Los ácidos grasos se encuentran integrados en las membranas formando fosfolípidos, que son los lípidos predominantes en las membranas biológicas y están formados por una cabeza hidrofílica y una cadena hidrofóbica de ácidos grasos. La síntesis *de novo* de los ácidos grasos se consigue por la condensación secuencial de dos carbonos derivados de la acetil-CoA. Cuando se descubrió que el CO<sub>2</sub> era necesario para la biosíntesis de ácidos grasos, se creyó que las mismas enzimas eran responsables tanto de la síntesis como de la  $\beta$ -oxidación de los mismos. La posterior identificación del malonyl-CoA, el producto de la carboxilación de la acetil-CoA, como intermediario único en la biosíntesis de ácidos grasos, proporcionó una evidencia concluyente para separar ambos tipo de rutas (Wakil et al., 1983). Otra evidencia de que la síntesis de ácidos grasos no es el reverso de su oxidación, es que se encuentran en compartimentos intracelulares distintos, ya que la síntesis se lleva a cabo en el citoplasma y la oxidación en la matriz mitocondrial. Además, ambos tipos de reacciones utilizan distintos cofactores nucleótidos. La oxidación de las grasas incluye la reducción del FAD<sup>+</sup> y NAD<sup>+</sup>, mientras que la síntesis involucra la oxidación de NADPH.

Los ácidos grasos pueden ser sintetizados *de novo* por la ácido graso sintasa (FAS) o en el citosol a partir de precursores de la dieta por enzimas específicas localizadas en el retículo endoplasmático llamadas desaturasas y elongasas, como se detallará en el siguiente apartado. Complementariamente a la síntesis, encontramos el proceso inverso: la  $\beta$ -oxidación o degradación de los ácidos grasos (Knoop, 1904). El metabolismo de los ácidos grasos requiere primero una activación de los mismos para convertirlos en ácidos grasos-CoA tioésteres. Esta reacción es llevada a cabo por un grupo de acil-CoA sintetasas, dependientes de ATP, que se diferencian por su localización subcelular y su especificidad por ácidos grasos de diferente longitud de cadena. Las específicas para ácidos grasos de cadena corta se encuentran en el citosol (activan ácidos grasos para lipogénesis) o en la mitocondria (activan ácidos grasos para oxidación); las específicas para ácidos grasos de cadena intermedia en la mitocondria y las específicas para ácidos grasos de cadena larga, que son proteínas ancladas a la

membrana del retículo endoplásmico, en los peroxisomas y la membrana externa mitocondrial.

El principal compartimento celular donde se desarrolla la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos es la mitocondria. Las enzimas encargadas de llevar a cabo este proceso se encuentran en la matriz mitocondrial. Puesto que la membrana mitocondrial interna es impermeable a CoA y sus derivados, los ácidos graso-CoA tioésteres tiene que atravesarla unidos a la proteína transportadora L-carnitina. Es importante sobre todo para el transporte de ácidos grasos de cadena larga, ya que los ácidos grasos de cadena corta y media (de menos de diez átomos de carbono) pueden atravesar la membrana interna mitocondrial independientemente de la carnitina. Las enzimas de la  $\beta$ -oxidación se encuentran en la membrana interna o en la matriz mitocondrial (Vance y Vance, 1996). La secuencia de reacciones y las interacciones entre síntesis y oxidación de ácidos grasos se detallan en la figura 8.

A pesar que la mitocondria es el sitio principal donde se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación, existen otros orgánulos que contienen las enzimas necesarias para oxidar los ácidos grasos, como es el caso del **peroxisoma**. Una de las diferencias entre la  $\beta$ -oxidación peroxisómica y la mitocondrial es la especificidad respecto a los acil-graso CoA que se aceptan como sustrato, ya que el peroxisoma oxida específicamente ácidos grasos de cadena muy larga, como el docosahexaenoico (22:6n-3) y ácidos grasos ramificados. Los peroxisomas no contienen las enzimas del ciclo del ácido cítrico, y no pueden catalizar la oxidación del acetil-CoA a CO<sub>2</sub>. Por ello, solamente catabolizan los ácidos grasos de cadena larga hasta convertirlos en ácidos grasos de cadena más corta, que son exportados a la mitocondria para oxidarse completamente (Nelson y Cox, 2009).



**Figura 8. Regulación de la síntesis y degradación de ácidos grasos.** Existen dos enzimas claves en la coordinación del metabolismo de los ácidos grasos: la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la carnitina aciltransferasa I (CPTI), que limita el transporte de los ácidos grasos a la mitocondria para la  $\beta$ -oxidación. Tras una subida de glucosa en sangre, se libera insulina. Entonces, la proteína fosfatasa dependiente de insulina desfosforila a la ACC activándola para que catalice la formación de malonil-CoA, que a su vez inhibe la CPTI impidiendo la entrada de ácidos grasos en la mitocondria. En periodos de ayuno, cuando disminuye la glucosa en sangre, se libera glucagón; que activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PK), que fosforila e inactiva la ACC. Esto hace que descendan los niveles de malonil-CoA, la CPTI se encuentre activa y permita la entrada de ácidos grasos a la mitocondria para su combustión (Modificado de Vance y Vance, 1996).

### 3.3. Modificación de la longitud de la cadena: desaturasas y elongasas

El proceso de elongación/desaturación de los ácidos grasos mantiene la homeostasis lipídica y confiere funciones específicas a cada molécula dependiendo de la longitud y el grado de insaturación de la cadena. La longitud de la cadena es un parámetro crucial en la estructura y estabilidad de las membranas. Debido a su baja solubilidad, las cadenas de ácidos grasos se asocian unas con otras con sus extremos apolares enfrentados formando bicapas lipídicas, de modo que cuando aumenta la longitud de la cadena de estos ácidos grasos, disminuye su solubilidad y su punto de

fusión. Así, nos encontramos con estructuras de membrana rígidas cuando están formadas por ácidos grasos saturados o monoinsaturados; pero en determinadas ocasiones necesitamos una mayor flexibilidad de las mismas, y esto se consigue mediante la introducción de un doble enlace, que permite una curvatura de la membrana de 30° con respecto a la cadena de ácidos grasos saturados y genera un mayor grado de polaridad alrededor de dicho doble enlace. (Vance y Vance, 1996). Por ello el sistema de desaturación/elongación de los ácidos grasos adquiere gran importancia al referirnos al estado y funcionamiento de las membranas biológicas en general, y en particular, como es el caso de la presente tesis, a la membrana mitocondrial.

En células eucariotas, tanto los ácidos grasos sintetizados en el citosol por la enzima ácido-graso sintasa como los derivados de la dieta, pueden ser sometidos a procesos de desaturación y/o elongación para dar lugar a ácidos grasos de cadena larga (16 y 18 carbonos) y de cadena muy larga ( $\geq 20$  carbonos) por la acción de enzimas específicas localizadas en el retículo endoplásmico. Los ácidos grasos poliinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFAs) son generalmente sintetizados por la modificación de sus precursores, ácidos grasos saturados, mediante la inserción de dobles enlaces por enzimas desaturasas y la elongación mediante incrementos de dos carbonos por acción de las enzimas elongasas (Nakamura et al., 2004). La expresión de ambas enzimas, desaturasas y elongasas, está controlada por factores específicos de tejido, indicando que están implicadas en diversas vías de síntesis que pueden alterar los niveles de distintos ácidos grasos en respuesta a diferentes estímulos. (Guillou et al., 2010).

- **Desaturasas:** las acil-CoA desaturasas son enzimas que introducen un doble enlace en una posición específica de la cadena de los ácidos grasos. Este proceso se ve influenciado por las propiedades biológicas de cada ácido graso o del lípido que lo contiene. En mamíferos se expresan las actividades desaturasa  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  en función de la posición donde introducen el doble enlace. A su vez, las desaturasas se clasifican también atendiendo al tipo de ácido graso sobre el que actúan, dividiéndose en dos grupos: estearoil-CoA desaturasas

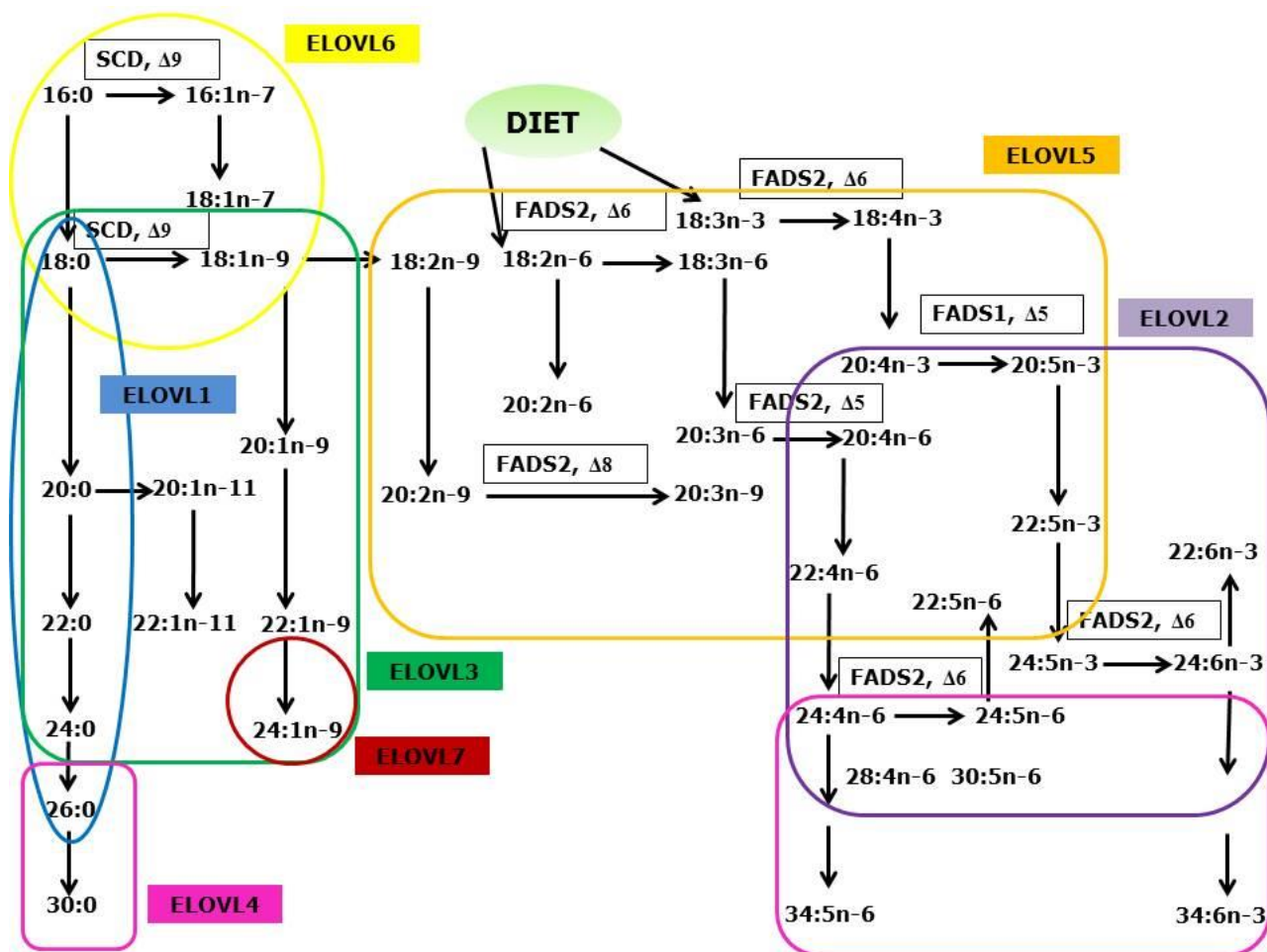
(**SCD**), que muestran la actividad  $\Delta 9$ , y desaturasas de ácidos grasos (**FADS**), que comprenden enzimas con actividad  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$ .

- **Elongasas:** para el proceso de elongación se requieren cuatro reacciones enzimáticas: condensación de una molécula de ácido graso-CoA con una de malonil-CoA; reducción del 3-cetoacil-CoA formado; deshidratación y, finalmente, reducción para formar el nuevo acil-CoA elongado. La primera de estas cuatro reacciones, es la limitante en el proceso, y es catalizada por las enzimas elongasas ELOVLs, del inglés *Elongation of very-long-chain fatty acids*. Hasta la fecha se han descrito siete proteínas, identificadas como **ELOVL1**, **ELOVL3**, **ELOVL6** y **ELOVL7**, que prefieren ácidos grasos saturados y monoinsaturados como sustrato, y **ELOVL2**, **ELOVL4** y **ELOVL5** que son selectivas para PUFAs.

Una descripción detallada del mecanismo de acción y la función específica de cada una de estas enzimas se encuentra en revisiones como (Leonard et al., 2004; Guillou et al., 2010). La acción de estas enzimas en el proceso de modificación del grado de insaturación y longitud de la cadena para dar lugar a los diferentes tipos de ácidos grasos se detalla en el esquema de la figura 9.

Esta diversidad de especies de ácidos grasos que van a formar los distintos fosfolípidos en las membranas, requiere rutas metabólicas de regulación complejas (Vance y Vance, 1996). Por ejemplo, las células eucariotas invierten alrededor del 5% de sus genes en sintetizar estos lípidos (van Meer et al., 2008). La composición de los lípidos de membrana se mantiene en principio mediante una regulación en feedback de la biosíntesis de fosfolípidos. Estudios recientes muestran la acción de un factor de transcripción anclado a la membrana llamado SREBP, (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) que parece dirigir la composición de la membrana celular y, de acuerdo a ello, ajustar la síntesis de lípidos (Dobrosotskaya et al., 2002).





**Figura 9. Biosíntesis de los ácidos grasos de cadena larga y de cadena muy larga en mamíferos.** Los procesos de desaturación se muestran con flechas horizontales y los de elongación con flechas verticales. Los colores de los diferentes compartimentos se corresponden con la acción de las correspondientes elongasas, indicadas también en colores; y las superposiciones entre los mismos indican que varias de las enzimas pueden intervenir en un mismo paso de la ruta. Los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 solo pueden sintetizarse a partir de precursores de la dieta (18:2n-6 y 18:3n-3), mientras que los de las series restantes pueden ser sintetizados a partir de ácido palmítico (16:0) que proviene de la síntesis en el citosol por la enzima ácido graso sintasa (Modificado de Vance y Vance, 1996 y Guillou et al., 2010).

En la presente tesis doctoral, nos hemos centrado en el estudio de una de las enzimas elongasas, en concreto la ELOVL2, que se encuentra altamente expresada en testículos e hígado (Tvrdik et al., 2000). Para comprobar la función de esta enzima, se generó un ratón “Knocked out”, con la ausencia del gen *Elovl2* (*Elovl2*<sup>-/-</sup>). En un primer estudio, se comprobó el efecto de la ausencia de esta enzima en los testículos, detectando niveles distorsionados de PUFAs C20 y C22 de ambas series (n-3 y n-6) en los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup>, lo que les causó esterilidad por una completa detención en la

espermatogénesis. En los ratones *Elovl+/-* se observó como la elongasa *ELOVL2* controla los niveles de los ácidos grasos 28:5n-6 y 30:5 en los testículos que derivó en una haploinsuficiencia traducida en severos problemas de fertilidad debido a anomalías en la formación de la cabeza de los espermatozoides (Zadravec et al., 2011).

### **3.4. Relación de los lípidos con la función mitocondrial y la longevidad animal**

Los ácidos grasos juegan un papel importante tanto en **la estructura como en la función mitocondrial**, ya que pueden actuar como sustratos oxidativos, inhibidores de la oxidación de carbohidratos, como ligandos para receptores nucleares que regulan la expresión de proteínas mitocondriales y, por supuesto, como componentes estructurales en la membrana mitocondrial (Lopaschuk et al., 2010). El fosfolípido más específico de la mitocondria es la cardiolipina (CL), un fosfolípido aniónico que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y está relacionado con varios procesos que regulan la función mitocondrial. La cardiolipina contiene cuatro ácidos grasos insaturados y un solo esqueleto de glicerolfosfato (Hatch, 1998). En la mayoría de los tejidos de mamíferos, el ácido graso predominante en la CL es el ácido linoleico (18:2n-6) (Hoch, 1992; Schlame et al., 2005). La CL es necesaria para el correcto funcionamiento de varios complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que está relacionada con procesos tan esenciales como la generación de ATP (Hoch, 1992; Mileykovskaya et al., 2005), la conducción de protones a través del citocromo bc1 (Lange et al., 2001), así como en la prevención de la inestabilidad osmótica y el desacoplamiento de la cadena cuando la tasa de respiración es elevada (Koshkin y Greenberg, 2002). La reducción en la cantidad de este fosfolípido, que compone el 10% de los fosfolípidos mitocondriales, altera el potencial de membrana (Jiang et al., 2000), la fosforilación oxidativa (Pfeiffer et al., 2003; McKenzie et al., 2006), la organización de los complejos de la cadena de transporte de electrones en supercomplejos (Claypool et al., 2008; Mileykovskaya et al., 2012), la osmolaridad de la matriz mitocondrial (Koshkin y Greenberg, 2002) y la morfología de las crestas mitocondriales (Xu et al., 2006).

Pero no solo la cantidad de cardiolipina (o de otros lípidos) es importante, sino también la composición específica de cada molécula y los cambios en el grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos, que puede interferir, por ejemplo, con el correcto funcionamiento de la mitocondria, modificando la fuga de electrones en el estado 4. Por ejemplo, en dietas deficientes en ácido linoleico, esta deficiencia se compensa con un aumento del ácido graso 20:3n-6, lo que incrementa la respiración en el estado 4 y la fuga de electrones. Así como la CL juega un papel importante en la regulación de la fuga de electrones, otros fosfolípidos mitocondriales, como las fosfatidilcolinas (PC) y fosfatidiletanolaminas (PE) regulan el estado 3 de la respiración mitocondrial, es decir, la fosforilación de ADP, de modo que un incremento en el 18:2n-6 en estos fosfolípidos disminuyen la respiración en el estado 3 (Hoch, 1992; Hoch, 1998). Desde un punto de vista más global, una deficiencia de ácidos grasos esenciales en la dieta provocaría un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa debido a un descenso en los ácidos grasos 18:2n-6 y 20:4n-6 en los fosfolípidos de la membrana (Yamaoka et al., 1988).

Por otro lado, como se ha mencionado en el apartado 1.3. de esta introducción, uno de los dos factores que correlacionan en el sentido adecuado con la longevidad (junto con una baja producción mitocondrial de ROS) es la **disminución en el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas** (menor índice de dobles enlaces, DBI: *Double bound index*, y menor índice de peroxidizabilidad, PI: *Peroxidizability index*, este último calculado en base a las tasas relativas de peroxidación de los diferentes ácidos grasos que componen las membranas) (Pamplona et al., 2002a; Hulbert et al., 2007; Pamplona y Barja, 2011). Este bajo grado de insaturación, disminuiría la intensidad de la peroxidación lipídica en las membranas y con ello el daño a proteínas tisulares (Pamplona y Barja, 2011), al igual que disminuiría la formación de especies químicas tóxicas y radicales secundarios (Spiteller, 2010; Zimniak, 2011). Este efecto no se consigue a través de una reducción en la cantidad total de PUFAs presentes en la membrana, sino a través de una redistribución de los ácidos grasos insaturados (Pamplona et al., 2002c). Así, los ácidos grasos insaturados araquidónico (20:4n-6) y especialmente el ácido docosahexaenoico (22:6n-3) son sustituidos en las especies

longevas por sus precursores, el ácido linoleico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3), para conferir a sus membranas una mayor resistencia a la peroxidación lipídica.

Un bajo grado de insaturación se ha observado tanto en las membranas celulares como mitocondriales en todas las especies longevas estudiadas hasta la fecha, en 21 estudios diferentes en distintos laboratorios (Naudi et al., 2013). Estos estudios se han llevado a cabo en varias especies de aves y de mamíferos (Figura 10), en especial en animales longevos como: a) **La rata topo desnuda** (*naked –mole rats*) *Heterocephalus glaber*, que con una longevidad de 28 años, muestra, con respecto al ratón, niveles similares de PUFAs pero cantidades muy bajas del ácido 22:6n-3, lo que disminuye el PI y confiere a sus membranas una mayor resistencia a la peroxidación lipídica; b) El mamífero monotrema **equidna**, *Tachyglossus aculeatus*, con una longevidad de 50 años (3,7 veces superior a la que le correspondería por talla corporal) muestra niveles reducidos de PUFAs, sobre todo los pertenecientes a la serie n-3, y en especial niveles muy bajos del ácido graso 22:6n-3 (Hulbert et al., 2008); c) **Humanos**, donde se ha demostrado que la composición de las membranas eritrocitarias de la descendencia de individuos nonagenarios difiere significativamente de sus controles, siendo menor el PI en la descendencia de los humanos longevos (Puca et al., 2008), al igual que ocurre con el perfil lipídico del plasma de la descendencia femenina de nonagenarios, dónde se encontró un mayor índice MUFA/PUFA que en los controles indicando una mayor resistencia al estrés oxidativo (Gonzalez-Covarrubias et al., 2013) ; d) **Insectos**, como en **abejas** (*Apis mellifera*), en las que se observa una importante diferencia en la longevidad de los ejemplares femeninos, que pueden llegar a ser reinas, y vivir muchos más años que aquellas destinadas a ser obreras. La diferencia entre ellas radica principalmente en la alimentación, ya que las obreras se alimentan de polen desde el inicio de su vida y las reinas lo hacen de secreciones de jalea real, con un contenido mucho más bajo en PUFAs. Tras una semana alimentándose de polen, las jóvenes obreras ya incrementan dramáticamente los niveles de PUFAs en sus membranas, lo que podría explicar que vivan mucho menos que las reinas; d) **Nematodos** como *Caenorhabditis elegans* (Shmookler Reis et al., 2011); y e) El más longevo de los metazoos de vida libre (501 años), el **mejillón bivalvo** *Arctica islandica*, que muestra

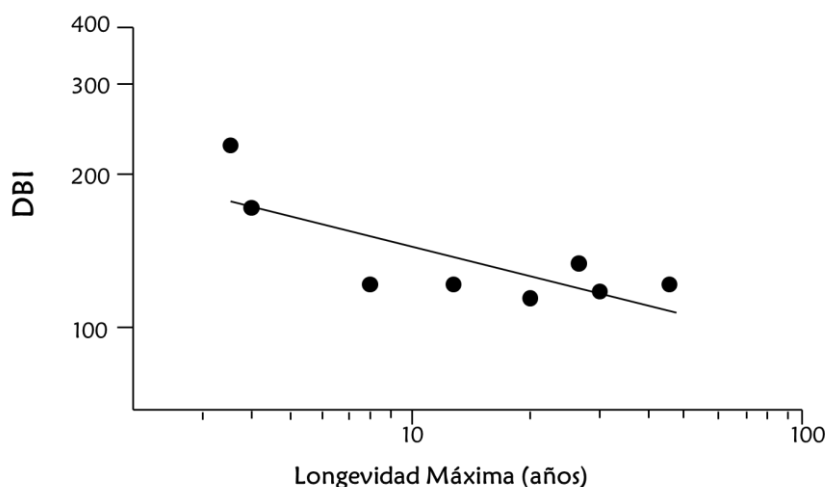
también un menor PI que el de otros moluscos bivalvos relacionados (Munro y Blier, 2012).

Todas estas observaciones, realizadas a nivel celular o tisular, pueden extenderse a nivel de lípidos en plasma, como se indica en un estudio reciente que compara el perfil plasmático de 11 especies de mamíferos con diferentes longevidades (en un rango de 3,5 a 120 años); poniendo de manifiesto que cuanto menor es la concentración de ácidos grasos de cadena larga en plasma, mayor es la longevidad máxima de la especie (Jove et al., 2013).

Dentro de la misma especie (ratón) se han llevado a cabo estudios comparando diferentes cepas, observando como dos cepas derivadas del genotipo silvestre tienen una longevidad mayor que otra cepa de ratón genéticamente heterogéneo y de laboratorio (Miller et al., 2002a). La composición de los ácidos grasos de sus membranas difiere entre estas tres cepas, estando su PI relacionado con el grado en que aumenta la longevidad. Dado que las tres cepas de ratones fueron alimentados con la misma dieta, se pone de manifiesto que las diferencias en la composición de membrana no se determinan por diferencias en la dieta, sino que están genéticamente controladas (Hulbert et al., 2006). En la misma línea, encontramos la cepa de ratón de senescencia acelerada SAM (*Senescence-Acelerated Mouse*). Los ratones propensos a la senescencia (SAM-prone) presentan en sus membranas niveles altos de los ácidos grasos altamente insaturados 22:6n-3 y 20:4n-6 y niveles más bajos del PUFA menos insaturado 18:2n-6, por lo que tienen un PI más alto que la cepa de ratones resistentes a la senescencia (SAM-resistant) (Park et al., 1996).

Los mecanismos responsables de estas diferencias en el perfil lipídico, podrían ser la vía de desaturación de los ácidos grasos y el ciclo de deacilación-reacilación, responsables de la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares. Las especies longevas presentan menor actividad de las enzimas desaturasas  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  que las especies de vida corta (Pamplona et al., 2002c), lo que podría explicar los bajos niveles de los ácidos grasos altamente insaturados (22:6n-3 y 20:4n-6) y altos de sus precursores (18:2n-6 y 18:3n-3) (Figura 9) y, además, el ciclo de deacilación-reacilación también podría tener un papel importante en la regulación de su composición lipídica,

dado que es el responsable de la introducción de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de membrana (Portero-Otin et al., 2001).



**Figura 10: Relación entre la longevidad máxima (MLSP) y el índice de dobles enlaces (DBI) en los fosfolípidos de corazón de 8 especies de mamíferos** (Pamplona et al., 2000). Las especies utilizadas fueron, de menor a mayor longevidad: Ratón (*Mus musculus*, MLSP = 4 años), Rata (*Rattus norvegicus*, MLSP = 5 años), Cobaya (*Cavia porcellus*, MLSP = 12 años), Conejo (*Oryctolagus cuniculus*, MLSP = 13 años), Oveja (*Ovis aries*, MLSP = 19 años), Cerdo (*Sus scrofa*, MLSP = 21 años), Vaca (*Bos taurus*, MLSP = 49 años) y Caballo (*Equus caballus*, MLSP = 57 años).

El principio en que se basa esta hipótesis, se confirma hasta cierto punto de manera experimental con un estudio llevado a cabo en *C. elegans* (Shmookler Reis et al., 2011), mostrando que la longevidad de gusanos longevos mutantes, similares genéticamente, correlaciona con el grado de insaturación de los ácidos grasos en el mismo sentido que en la comparación entre especies mencionada anteriormente. Además, en este estudio, el silenciamiento de la expresión de algunas enzimas elongasas y desaturasas involucradas en la síntesis de los ácidos grasos altamente insaturados (n-3 y n-6) que presentan en menor proporción los animales longevos, incrementó la longevidad de los gusanos. Este hecho aumenta las probabilidades de que la hipótesis sea correcta, pero es necesario demostrar que ocurre lo mismo en mamíferos antes de establecer firmemente el concepto de que el bajo grado de insaturación de los ácidos grasos contribuye a la longevidad animal.

El hecho de que hasta el momento no existan investigaciones que demuestren de forma directa el efecto de la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas sobre la longevidad en mamíferos, se debe a la dificultad que

conllevar modificar este parámetro. En las membranas celulares de los principales órganos la composición lipídica de las membranas se controla por mecanismos homeostáticos, específicos de cada especie, que compensan las modificaciones sufridas en la composición lipídica habitual con cambios en la insaturación de los lípidos obtenidos de la dieta. En algunos casos, estos mecanismos homeostáticos se han podido eliminar parcialmente en estudios a corto plazo, incluyendo aceite de maíz al 0,5% en dietas semipurificadas saturadas en grasa (con un 9,5% de aceite de coco hidrogenado), obteniendo ratas con una baja insaturación de los ácidos grasos de membrana en cerebro y en hígado, junto con un menor daño al ADN mitocondrial y a las proteínas (Pamplona et al., 2004). Sin embargo, el uso de estas dietas no es adecuado para realizar estudios de longevidad a largo plazo, ya que alimentar a los animales con grasas saturadas conlleva niveles poco saludables de lípidos en plasma, como por ejemplo el incremento en los niveles de colesterol.

En resumen, **los animales con una longevidad elevada muestran un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana basado en la redistribución entre los distintos tipos de PUFAs sin alterar el contenido total (%) de éstos, la longitud media de la cadena y la distribución de fosfolípidos.** Esto podría ser considerado como una estrategia evolutiva porque disminuiría la sensibilidad frente al daño oxidativo, tanto de manera directa (peroxidación lipídica) como indirecta (lipoxidación) sin alterar la fluidez y la microviscosidad de la membrana, fundamental para el funcionamiento correcto de receptores, bombas iónicas y transporte de metabolitos. Así, la fluidez de la membrana se incrementa de forma drástica tras la introducción del primer y segundo doble enlace, pero la adición de los siguientes dobles enlaces causa menor impacto (Brenner, 1984). Por ello al sustituir ácidos grasos con cuatro o seis dobles enlaces por otros con dos o tres, disminuye la sensibilidad a la peroxidación lipídica y se modifica poco la fluidez de la membrana. Este mecanismo se ha denominado adaptación homeoviscosa a la longevidad de los homeotermos (Pamplona et al., 2002c). De acuerdo con esta interpretación, se ha demostrado, mediante un estudio filogenético comparando 5,7 millones de codones en 25 especies, que los genes involucrados en la composición lipídica (particularmente en el sistema de desaturación), han sido sometidos a una presión selectiva a lo largo de la evolución

en las especies longevas, siendo el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares la característica optimizada (Jobson et al., 2010).

#### 4. DAÑO OXIDATIVO A MACROMOLÉCULAS

Los diferentes tipos de macromoléculas biológicas son susceptibles a sufrir daños por ataque oxidativo, bien directo por los radicales libres generados en la mitocondria, o indirecto por endoperóxidos lipídicos generados tras el ataque de los ROS a los lípidos de las membranas. La magnitud del daño generado va a depender de la intensidad del ataque, la susceptibilidad de las macromoléculas a ser modificadas oxidativamente y por su capacidad de ser reparadas.

##### 4.1. Lípidos

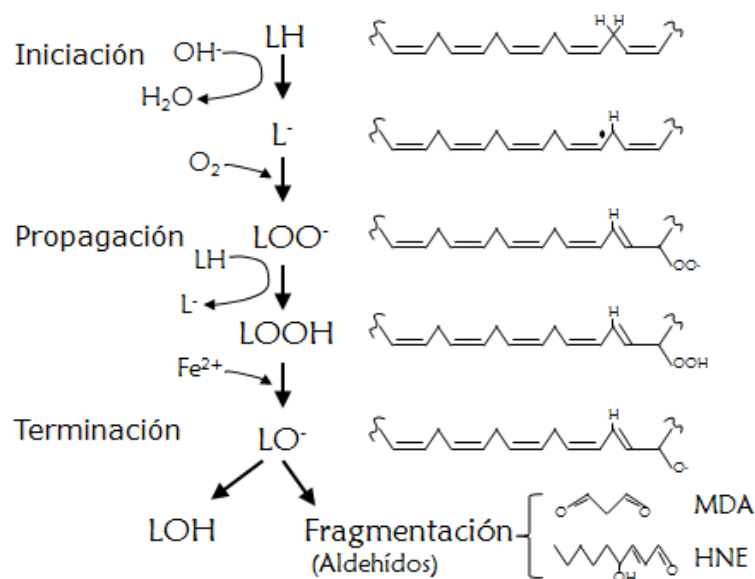
Los fosfolípidos que forman parte de las membranas son susceptibles al daño oxidativo debido a dos razones: **a) las propiedades físico-químicas de la membrana:** el oxígeno y los radicales libres son más solubles en la bicapa lipídica que en una solución acuosa, por lo tanto su concentración es mayor en el interior de la fase orgánica de las membranas así como su disponibilidad para llevar a cabo las reacciones químicas que desencadenan el daño oxidativo (Moller et al., 2005; Gamliel et al., 2008; Pamplona, 2008); **b) la reactividad química de los ácidos grasos que componen la membrana:** los residuos de PUFAs son altamente sensibles a la oxidación debido a la presencia de un grupo metileno entre dos dobles enlaces, que los hace especialmente sensibles al ataque de ROS y esta sensibilidad aumenta exponencialmente en función del número de dobles enlaces por cada molécula de ácido graso; esto hace que los PUFA sean atacados con mayor facilidad que los ácidos grasos saturados o monoinsaturados (Holman, 1954; Bielski et al., 1983).

El daño oxidativo a los lípidos se traduce en procesos de peroxidación lipídica. Las especies reactivas capaces de generar dicho fenómeno son el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. El radical superóxido y el peróxido de hidrogeno no son capaces de iniciar la peroxidación lipídica por si solos, pero en presencia de metales de transición, como el hierro y el cobre, pueden llegar a generar radicales hidroxilo que si son capaces de iniciar dicha peroxidación.



La peroxidación lipídica se produce en tres fases: iniciación, propagación y terminación (Figura 11). En la fase de iniciación, el radical libre extrae un electrón de un átomo de carbono contiguo a un doble enlace del ácido graso, lo que origina la aparición de un radical alquilo ( $L^{\cdot}$ ) que forma enlaces cruzados dentro de la molécula o reacciona con otras moléculas diferentes, frecuentemente con el oxígeno, lo que genera el radical peroxilo ( $LOO^{\cdot}$ ). Este radical reacciona con el doble enlace de un ácido graso adyacente, dando lugar a la fase de propagación, generando una reacción en cadena dado que se forma un hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ) y un nuevo radical alquilo que puede iniciar nuevas reacciones con otras moléculas (Marnett, 1999). Por lo tanto, a partir de sólo un ácido graso alterado en la etapa de iniciación se puede dañar una gran cantidad de moléculas. Aunque los hidroperóxidos son bastante estables, en presencia de metales de transición y en una reacción análoga a la de Fenton se puede producir su reducción y la formación de un radical lipídico alcoxil ( $LO^{\cdot}$ ), que puede fragmentarse dando lugar a diferentes aldehídos que son relativamente estables y pueden difundir a través de la célula y reaccionar con otras moléculas (Spiteller, 2010; Winczura et al., 2012; Lenaz, 2012a).

Además, junto al daño directo a lípidos, la peroxidación lipídica conlleva una serie de reacciones paralelas, que determinan la formación de compuestos cíclicos, endoperóxidos que, al descomponerse, forman productos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Todos estos productos son muy reactivos, y al ser más estables que los ROS pueden migrar fácilmente a través de las membranas reaccionando con otras moléculas como proteínas y ADN (Pamplona, 2011), o pueden ser metabolizados mediante la conjugación con glutatión o por reacciones redox (oxidación o reducción del grupo aldehído). El hecho de que estos endoperóxidos reaccionen con otras macromoléculas, como proteínas, puede hacer que causen toxicidad o incluso que modulen determinadas rutas de señalización reaccionando, como en el caso del 4-HNE, con proteínas mitocondriales.



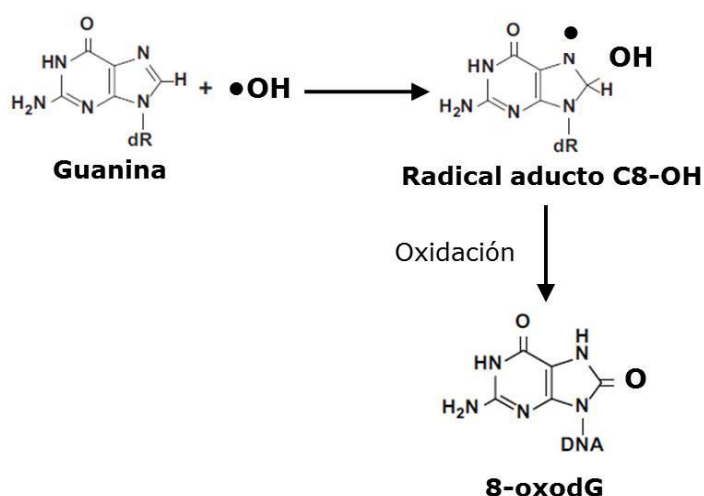
**Figura 11. Esquema de las reacciones principales que se producen durante la peroxidación lipídica.** LH = lípido intacto; L<sup>·</sup> = Radical lipídico alquil; LOO<sup>·</sup> = radical lipídico peroxil; LOOH = hidroperóxido lipídico; LO<sup>·</sup> = radical lipídico alcóxil; LOH = hidróxido lipídico; MDA= Malondialdehído; HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

## 4.2. ADN

El daño oxidativo al ADN es, sin duda, el más importante en el proceso de envejecimiento, ya que las demás macromoléculas, en caso de estar dañadas, pueden reemplazarse y sintetizarse de nuevo a partir de la información codificada en el genoma, pero en cambio el ADN es irremplazable, cuando se pierden todas las copias de un gen en unas células concretas, y sus alteraciones pueden causar daños irreparables para la célula (Marnett y Plataras, 2001).

El radical hidroxilo (formado a partir del anión superóxido en presencia del hierro liberado por el ataque del mismo a los centros hierro-sulfurados del complejo I) reacciona con componentes de la molécula de DNA dañando las bases púricas, pirimidínicas y el esqueleto de desoxirribosa (Cooke et al., 2003) formando más de 20 tipos de aductos (Barciszewski et al., 1999). De todos ellos, el 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (también conocida como su isómero 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina; 8-oxodG) es el más estudiado debido a su potencial mutagénico y porque se puede detectar de forma fiable y sencilla por HPLC-EC, siendo el biomarcador más utilizado para cuantificar el daño oxidativo al ADN (Figura 12) (Dizdaroglu, 1992). Las

modificaciones causadas por el daño oxidativo al ADN incluyen roturas de una o las dos hebras del ADN, modificaciones en la purina, la pirimidina o la desoxirribosa, mutaciones puntuales, puentes cruzados, deleciones y translocaciones (Cooke et al., 2003; Cline, 2012), siendo las transversiones G:C/A:T las mutaciones espontáneas más frecuentes debido al potencial de la 8-oxodG de aparearse con adenosina en lugar de con citosina durante la replicación del ADN.

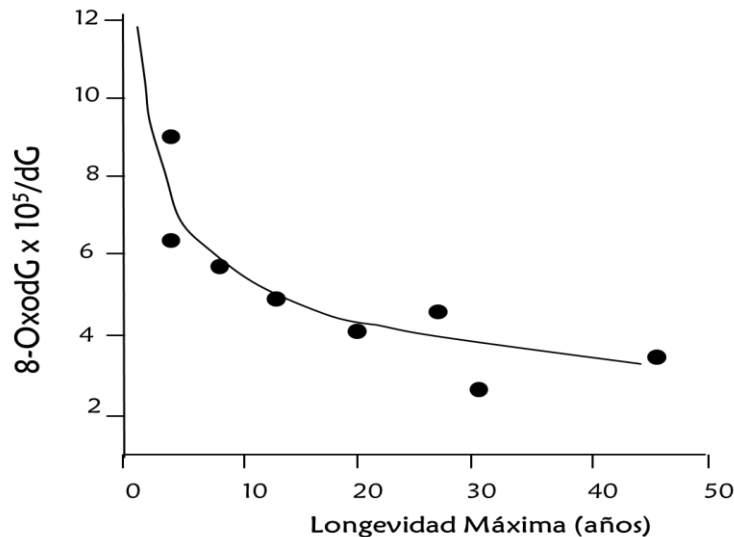


**Figura 12. Formación de la base modificada 8-hidroxiguanina, que da lugar al nucleósido 8-oxodG, el biomarcador más utilizado para cuantificar el daño al ADN.** La modificación de la guanina se produce mediante la oxidación en el carbono 8 por el radical hidroxilo. (Dizdaroglu y Jaruga, 2012). dR=2'- desoxirribosa.

El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el ADN nuclear, debido principalmente a tres razones: 1) El ADN mitocondrial está localizado muy cerca de la principal fuente de ROS (el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial) (Barja, 1993; Stuart et al., 2005); 2) La membrana mitocondrial interna es muy rica en ácidos grasos incluyendo a los insaturados, lo que aumenta el número de productos de la peroxidación lipídica capaces de dañar el ADN (Pamplona et al., 2004); 3) El ADN mitocondrial se encuentra desprotegido debido a la ausencia de histonas y la carencia de intrones, que hace que cualquier alteración afecte a una región de control o codificadora.

Estos daños en el ADN mitocondrial (producidos, entre otras causas, por el ataque directo o indirecto de los ROS mitocondriales) se acumulan con la edad, de modo que se inducirían alteraciones en la maquinaria respiratoria de la mitocondria generando un fallo energético que sería la base del envejecimiento de la célula (Miquel et al., 1980; Crott et al., 2005). Estas mutaciones incluyen deleciones a gran escala, duplicaciones en tándem y mutaciones puntuales. Sus niveles de acumulación son mayores en tejidos post-mitóticos con un metabolismo oxidativo activo, como es el caso de corazón, músculo esquelético y cerebro (Lee y Wei, 2012). Un apoyo importante a esta hipótesis es **la correlación negativa que se observa entre la longevidad máxima y los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial** de corazón y cerebro de animales homeotermos (mamíferos y aves), como se puede ver en la figura 13. (Barja y Herrero, 2000).

Sin embargo, nos encontramos con una serie de hechos que restan importancia a esta hipótesis; como la presencia de un elevado número de copias de ADN mitocondrial por célula, de modo que solamente si una gran mayoría de ellas estuvieran dañadas se comprometería la función bioenergética de la célula. Además, se ha demostrado que el porcentaje de células con ADN mitocondrial mutado en tejidos vitales es muy bajo en general (del 0,5 al 2%), a excepción algunos casos como la *substancia nigra* donde esta fracción de células con ADN mitocondrial con mutaciones es mayor (Bender et al., 2006; Falkenberg et al., 2007).



**Figura 13: Relación entre la longevidad máxima (MLSP) y el daño oxidativo al ADNmt, medido como 8oxodG x 10<sup>5</sup>/dG, en el corazón de diversas especies de mamíferos** (Barja y Herrero, 2000; Barja, 2004b). Las especies utilizadas fueron, de menor a mayor longevidad: Ratón (*Mus musculus*, MLSP = 4 años), Rata (*Rattus norvegicus*, MLSP = 5 años), Cobaya (*Cavia porcellus*, MLSP = 12 años), Conejo (*Oryctolagus cuniculus*, MLSP = 13 años), Oveja (*Ovis aries*, MLSP = 19 años), Cerdo (*Sus scrofa*, MLSP = 21 años), Vaca (*Bos taurus*, MLSP = 49 años) y Caballo (*Equus caballus*, MLSP = 57 años).

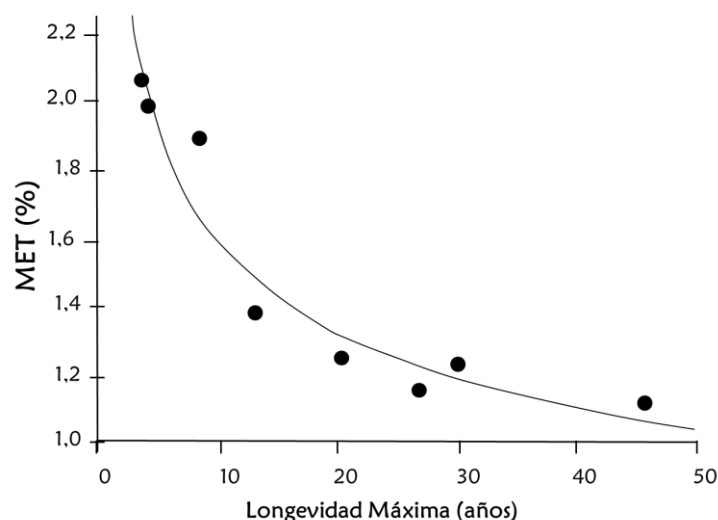
Para intentar explicar, a pesar de estas evidencias, el papel del daño oxidativo al ADN mitocondrial en el proceso de envejecimiento; pasamos de un modelo en el que la mitocondria es la fuente causante del daño y la diana del mismo, a otro en el que el núcleo se convierte en el receptor de dicho daño. Más del 99 % de los genes residen en el núcleo y, por consiguiente, es su alteración la que potencialmente puede tener una mayor transcendencia en el proceso de envejecimiento.

Los radicales libres producidos por la mitocondria pueden modificar las bases del ADN mitocondrial, pero también tienen la capacidad de generar fragmentos de este ADN. Se ha propuesto que estos fragmentos de ADN podrían llegar a escapar de la mitocondria para ser posteriormente integrados en el genoma nuclear. Esta acumulación de fragmentos de ADN mitocondrial en el núcleo que se produciría a lo largo del tiempo, podría cambiar la información codificada en el ADN nuclear y contribuir así a la formación de células tumorales y al proceso de envejecimiento (Richter, 1988). Esta transferencia de secuencias de ADN mitocondrial al núcleo ha sucedido a lo largo de la evolución en eucariotas (Blanchard y Lynch, 2000), encontrándose estos fragmentos insertados en el genoma nuclear de distintas especies tanto de plantas como de insectos, incluso en humanos (Gellissen et al., 1983;

Shay y Werbin, 1992; Juretic, 1995; Martin, 2003; Lough et al., 2008; 2012). Estudios recientes han demostrado que la presencia de ADN mitocondrial en el núcleo se ve incrementada con la edad tanto en hígado como en cerebro de rata (Caro et al., 2010) y en *Sacharomyces cerevisiae* (Cheng y Ivesa, 2010). Estas inserciones tienen potencial para alterar la información codificada en el ADN nuclear contribuyendo así al proceso de envejecimiento (Richter, 1988).

#### **4.3. Proteínas**

Las modificaciones oxidativas en las proteínas pueden alterar tanto su estructura como su función. Las reacciones llevadas a cabo para conseguir dichas modificaciones, se pueden dividir, atendiendo a su diana de ataque, en dos categorías: aquellas que modifican el esqueleto de la proteínas (la cadena polipeptídica) y aquellas que alteran las cadenas laterales de aminoácidos (Stadtman y Levine, 2000). La primera de ellas se caracteriza por la fragmentación de la cadena de polipéptidos (Davies, 1987), mientras que como resultado de la segunda aparecen una serie de productos diferentes. Algunos residuos son más susceptibles al ataque oxidativo, especialmente la metionina y la cisteína (Stadtman y Levine, 2003). Así, al aumentar la presencia del aminoácido metionina en las proteínas aumenta también la sensibilidad de éstas al daño oxidativo (Stadtman, 2004). Además, como se puede ver en la figura 14, se ha demostrado la existencia de una correlación negativa entre la longevidad máxima y el contenido de metionina en las proteínas de corazón en distintas especies de mamíferos (Ruiz et al., 2005).



**Figura 14: Relación entre la longevidad máxima (MLSP) en años y el contenido en metionina (%) en proteínas de corazón de 8 especies de mamíferos (Pamplona y Barja, 2006).** Las especies utilizadas fueron, de menor a mayor longevidad: Ratón (*Mus musculus*, MLSP = 4 años), Rata (*Rattus norvegicus*, MLSP = 5 años), Cobaya (*Cavia porcelus*, MLSP = 12 años), Conejo (*Oryctolagus cuniculus*, MLSP = 13 años), Oveja (*Ovis aries*, MLSP = 19 años), Cerdo (*Sus scrofa*, MLSP = 21 años), Vaca (*Bos taurus*, MLSP = 49 años) y Caballo (*Equus caballus*, MLSP = 57 años).

Otra de las modificaciones que sufren las proteínas es la carbonilación, para formar productos como el semialdehído glutámico (GSA) y el semialdehído amoniadípico (AASA), procedentes de la oxidación de arginina, prolina y lisina (Nystrom, 2005). Estas modificaciones son irreversibles e irreparables, por lo que son los marcadores de oxidación proteica más utilizados (Dalle-Donne et al., 2006).

Este proceso oxidativo también puede clasificarse atendiendo al tipo de reacciones que se producen; ya sean directas a proteínas o indirectas a otros tipos de macromoléculas (como lípidos o glúcidos) (Davies, 2003), que a su vez forman productos reactivos que dan lugar a aductos capaces de causar daño proteico mediante la formación de enlaces cruzados de forma covalente entre cadenas laterales de aminoácidos (Grune et al., 2001). Un ejemplo son los *Advanced Lipoxidation End-products* (ALEs) formados por productos de la peroxidación lipídica, que incluyen, entre otros, el aducto Nε-(malondialdehído)-lisina (MDAL) y sirven como marcadores del estrés lipooxidativo *in vivo* (Thorpe y Baynes, 2003). Por consiguiente, un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas, seguido de una baja concentración de ALEs, es una de las características que definen a los animales longevos (Pamplona et al., 2002a; Hulbert et al., 2007).

#### 4.4. Hidratos de carbono

Los radicales libres pueden intervenir también en la formación de azúcares reductores. Estos actúan sobre los residuos de aminoácidos en las proteínas mediante la reacción de Maillard; que es una glicosilación proteica no enzimática que conduce a la generación de compuestos estables e irreversibles denominados *Advanced Glycoxidation End-products* (AGEs) (Thorpe y Baynes, 2003; Lenaz, 2012a).

Los compuestos más característicos derivados de estas reacciones son el N $\epsilon$ -(carboximetil)-lisina (CML) y el N $\epsilon$ -(carboxietil)-lisina (CEL), y sirven como marcadores específicos del daño glicooxidativo a proteínas (Thorpe y Baynes, 2003).

Al igual que los ALEs, los niveles de AGEs correlacionan negativamente con la longevidad máxima en mamíferos (Sell et al., 1996), indicando su contribución al proceso de envejecimiento (Pamplona y Barja, 2007).

### 5. ¿CÓMO INCREMENTAR LA LONGEVIDAD MÁXIMA?

#### 5.1. Manipulaciones dietéticas

**La manipulación experimental mejor estudiada capaz de extender la longevidad media y máxima sigue siendo la restricción de la dieta (DR)** (McCay et al., 1935). Sus efectos sobre la longevidad se han observado en organismos tan diferentes como levaduras, rotíferos, arañas, nematodos, peces y roedores de laboratorio (Mair y Dillin, 2008). Entre los efectos beneficiosos que produce, aparte de extender la longevidad, se encuentra la protección frente a otras patologías relacionadas con la edad, tales como cáncer, nefropatías, sarcopenia, cardiomiopatías y neurodegeneración (Weindruch et al., 1988; Mattson, 2002; Weindruch, 2003; Martin et al., 2006; Jang et al., 2012). Estos efectos no solo se han observado en individuos jóvenes, sino también en animales de edades avanzadas (Yu et al., 1985; Dhahbi et al., 2004).

Los efectos de la restricción de la dieta se extienden también a humanos (Fontana et al., 2010) y otros primates como monos Rhesus. Este último caso ha suscitado cierta polémica debido a los resultados, en parte contradictorios, obtenidos



en dos laboratorios diferentes tras someter a los monos a una restricción calórica del 30% a largo plazo. Mientras que en el primer estudio (Colman et al., 2009) la DR redujo la mortalidad, la incidencia de diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y atrofia cerebral; en el segundo de los estudios (Mattison et al., 2012) la DR no fue capaz de producir efectos sobre la mortalidad ni sobre las enfermedades cardiovasculares, aunque si redujo la aparición de diabetes y de cáncer. Las diferencias entre estos dos trabajos radican principalmente en el diseño experimental, ya que mientras en el caso de Colman y colaboradores, las dietas utilizadas fueron semipurificadas y los animales control alimentados *ad libitum*; en el segundo caso (Mattison et al., 2012) las dietas no eran semipurificadas, perdiendo así el control sobre la presencia de sustancias desconocidas, y los animales control fueron alimentados con una cantidad fija, menor que la ingesta *ad libitum*, por lo que los controles estaban restringidos. Estos datos indican que la composición de la dieta puede ser un factor más importante que la cantidad total de calorías ingeridas, en relación con la longevidad.

Los mecanismos por los que la DR extiende la longevidad no han sido totalmente esclarecidos. Entre las muchas hipótesis propuestas, las más relevantes han sido la producción mitocondrial de ROS (Barja, 1993; Gredilla y Barja, 2005) y cambios en las vías de señalización Insulina/IGF-1, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) y sirtuinas (Mair y Dillin, 2008; Selman et al., 2008; Harrison et al., 2009).

La primera de estas hipótesis se encuentra apoyada por datos procedentes de la fisiología comparada, ya que **tanto los animales sometidos a DR al 40% a largo plazo como los animales longevos, presentan una menor producción mitocondrial de ROS en diferentes tejidos** (Sohal et al., 1994; Gredilla et al., 2001a; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005a; Hagopian et al., 2011; Jang et al., 2012). Como consecuencia de ello, se produce menor daño oxidativo a las diferentes macromoléculas, especialmente al ADN mitocondrial, se reduce el número de mutaciones y con ello la tasa de envejecimiento.

Tras varios años pensando que únicamente la cantidad de calorías ingeridas determinaba los efectos de la DR, se empezó a cuestionar si la composición de la dieta

sería la responsable de los cambios producidos durante dicha manipulación. Mientras que la información disponible no indica que la restricción de carbohidratos y la restricción lipídica aumenten la longevidad (Ross, 1976; Khorakova et al., 1990; Shimokawa et al., 1996), **la restricción proteica (PR) al 40% si indujo un incremento de la longevidad en roedores** (Miller y Payne, 1968; Horakova et al., 1988) y un descenso en la producción mitocondrial de ROS (Sanz et al., 2004). El siguiente paso fue determinar cuál de los aminoácidos que componen las proteínas era el responsable de esta disminución en la producción de ROS y la consiguiente extensión de la longevidad, concluyendo que **la disminución en la ingesta del aminoácido metionina (MetR) producía los mismos efectos que la PR** y similares a la DR [revisado en (Lopez-Torres y Barja, 2008; Sanchez-Roman y Barja, 2013b)].

Numerosos experimentos demuestran que **la restricción de metionina al 80% en la dieta incrementa la longevidad máxima en ratas** (Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994) **y ratones** (Miller et al., 2005; Sun et al., 2009), incluso cuando la intervención se inicia a edades avanzadas (12 meses de edad) (Sun et al., 2009). El incremento medio de la longevidad que se observa tras esta intervención es del 18%, similar al que ocurre tras la PR pero menor al caracterizado para la DR (40%), por lo que parte del efecto de la DR sobre la longevidad podría deberse a la menor ingesta de proteínas y en concreto del aminoácido metionina.

Además de extender la longevidad media y máxima, la MetR al 80% es capaz de reducir la incidencia de enfermedades degenerativas asociadas a la edad, disminuir el tejido adiposo visceral, el tamaño de los adipocitos, los niveles sanguíneos de IGF-1, triglicéridos, glucosa, colesterol y leptina, atenuar los cambios asociados a la edad del sistema inmune, disminuir el desarrollo de cataratas, el estrés oxidativo mitocondrial e inhibir el crecimiento de determinados tumores (revisado en Sanchez-Roman y Barja, 2013b).

Otro efecto importante de la MetR es la disminución en el estrés oxidativo mitocondrial, al igual que ocurre en la PR, DR y en los animales longevos (Lopez-Torres y Barja, 2008). Nuestro grupo de investigación, dirigido por el Dr. Gustavo Barja, ha demostrado que tanto la MetR al 80% como al 40% en ratas jóvenes durante 7

semanas, es capaz de disminuir la producción mitocondrial de ROS en el complejo I, la fuga de radicales libres, el daño oxidativo al ADN mitocondrial y los marcadores de modificación proteica en hígado de rata (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2008a). Estos efectos beneficiosos se obtuvieron también en otros órganos estudiados, como cerebro, riñón y corazón (Caro et al., 2009a; Sanchez-Roman et al., 2011). La MetR fue también capaz de revertir los efectos de la edad sobre el estrés oxidativo mitocondrial en hígado, aplicando esta manipulación a ratas viejas y comparándolas con ratas control viejas (24 meses de edad) y adultas (6 meses de edad) (Sanchez-Roman et al., 2012).

En el caso de la MetR al 80%, se observó también una disminución en la insaturación de los ácidos grasos de las membranas tanto en corazón como en hígado de rata (Sanz et al., 2006d). Sin embargo, en la MetR al 40% estos cambios solamente se observaron en corazón (Sanchez-Roman et al., 2011).

Para reafirmar esta idea, se demostró también que la restricción en la dieta de todos los aminoácidos exceptuando a la metionina no produce modificaciones en la producción mitocondrial de ROS ni en los niveles de 8-oxodG (Caro et al., 2009b), y que por otro lado, la suplementación de metionina en la dieta aumenta el estrés oxidativo mitocondrial (Park et al., 2008; Gomez et al., 2009), la peroxidación lipídica (Hidiroglou et al., 2004) y el daño a órganos vitales como corazón, riñón e hígado (Mori y Hirayama, 2000; Kumagai et al., 2002; Troen et al., 2003).

El grado de restricción de metionina es un factor importante a tener en cuenta, ya que la MetR al 80% comparte los efectos negativos de la DR como el retraso en el crecimiento y la disminución del tamaño corporal. Sin embargo estos efectos no aparecen en animales restringidos en metionina al 40%, manteniéndose los efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo mitocondrial (Caro et al., 2008a; Caro et al., 2009a). Esto es especialmente interesante si se pretende extrapolar este tipo de manipulaciones a la población humana, siendo la MetR al 40% la más indicada para este fin.

## 5.2. Manipulaciones genéticas

### 5.2.1. Relacionadas con la vía Insulina/IGF-1, TOR y sirtuinas

La manipulación genética de la longevidad se ha comenzado a desarrollar recientemente, describiéndose diferentes mutantes, la mayoría de ellos generados por la ausencia de un gen (*Knockout*, KO) que favorece el envejecimiento (Selman y Withers, 2011); observando un aumento en la longevidad de hasta un 40%. La mayoría de estos genes intervienen en la vía de señalización celular IIS: *Insulina/ Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)*, que ha sido propuesto como uno de los sistemas reguladores de la longevidad en diferentes especies animales, desde nematodos a mamíferos (Gems y Partridge, 2001).

Cabe destacar la existencia de dos modelos de ratones enanos, con mutaciones en un solo gen de esta vía, que presentan un incremento de la longevidad: los ratones *Ames dwarf* (Brown-Borg et al., 1996), que carecen del gen *Prop-1*; y los ratones *Snell dwarf* (Flurkey et al., 2001), que no tienen el gen *Pit-1*. La ausencia de cada uno de estos genes provoca una carencia en la hormona del crecimiento (GH), que estimula la liberación de hormonas tiroideas y prolactina, reduciendo la concentración de estas hormonas en sangre. También existen ratones KO para la GH (Coschigano et al., 2000; Bartke et al., 2001a), para el receptor de insulina (Selman et al., 2008) y para el receptor de IGF-1 (Holzenberger et al., 2003), en los que también se produce un aumento de la longevidad, aunque no tan acusado como en los dos modelos de ratones enanos.

La proteína TOR (*Target Of Rapamycin*) es una quinasa conservada evolutivamente, sensible a la ausencia de nutrientes, que regula el crecimiento y el metabolismo en las células eucariotas (Kapahi et al., 2010). Estudios llevados a cabo en nematodos, moscas, levaduras y ratones, apoyan la idea de que esta vía de señalización modula de algún modo el envejecimiento (Newberg et al., 2003; Vellai et al., 2003; Kapahi et al., 2004; Kaeberlein et al., 2005b). La vía TOR responde a la ingesta de nutrientes, de modo que cuando se detectan niveles bajos de aminoácidos, glucosa u oxígeno la vía se encuentra inhibida (lo que podría ser un nexo de unión con las manipulaciones dietéticas descritas anteriormente: DR, PR y MetR). Este descenso en

la actividad TOR incrementa la longevidad, al igual que la inhibición de la proteína ribosomal S6 kinasa 1 (que forma parte de la vía TOR), como se ha visto en levaduras, nematodos, moscas y ratones (Fabrizio et al., 2001; Selman et al., 2009; Kapahi et al., 2010). Siguiendo esta misma línea, se ha demostrado recientemente que la haploinsuficiencia de la proteína Akt1 (integrante de la vía mTOR) en ratones AKT1<sup>+/-</sup>, incrementa significativamente la longevidad media y máxima mediante mecanismos que implican la reducción del gasto energético y el estrés oxidativo (Nojima et al., 2013).

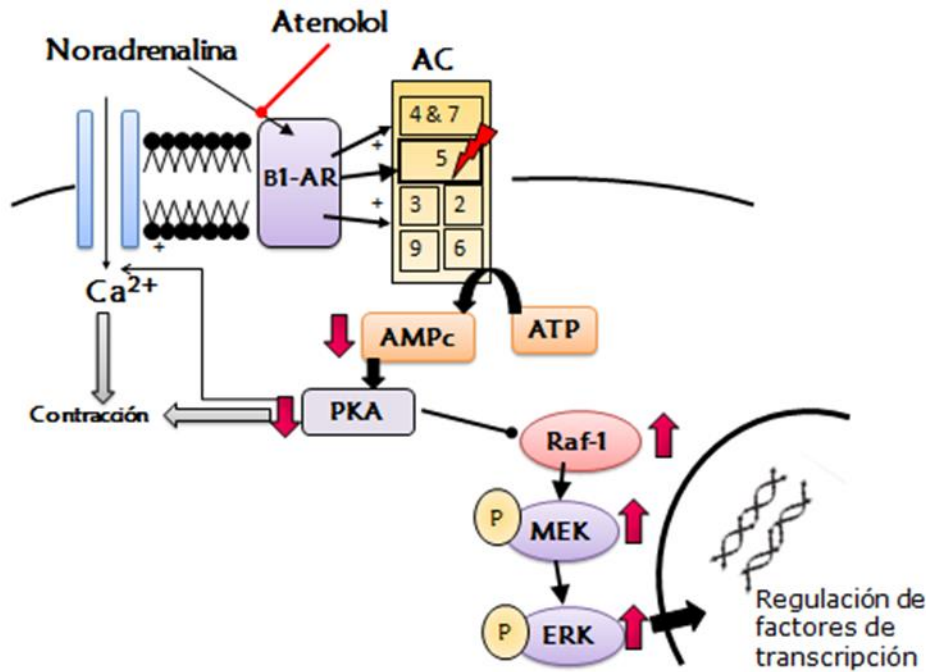
Las sirtuinas son un grupo de proteínas deacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup>, y su actividad comenzó a relacionarse con la longevidad cuando se descubrió que la sobreexpresión de Sir2 (homólogo de SIRT1 en mamíferos) era capaz de extender la longevidad en levaduras (Kaeberlein et al., 1999). Posteriormente se demostró que la sobreexpresión del mismo gen homólogo en moscas y gusanos también extendía la longevidad (Tissenbaum y Guarente, 2001; Rogina y Helfand, 2004). Sin embargo, estos descubrimientos se han puesto en duda recientemente proponiendo que la extensión de la longevidad observada tanto en nematodos como en moscas no era debida a la sobreexpresión del gen codificante de dicha sirtuina, sino a diferencias en el fondo genético de los diferentes individuos de cada grupo, y al uso de controles no apropiados (Burnett et al., 2011). Además al repetir el experimento cuidadosamente en *C. elegans*, la sobreexpresión del gen sir-2.1 solamente extendió ligeramente la longevidad (Viswanathan y Guarente, 2011).

En mamíferos existen 7 sirtuinas diferentes. Algunas de ellas, como la SIRT6 y la SIRT3 (además de la SIRT1), han sido relacionadas particularmente con el proceso de envejecimiento. Un ratón mutante deficiente en SIRT6 mostró un envejecimiento acelerado (Mostoslavsky et al., 2006), mientras que la sobreexpresión del gen SIRT6 incrementó significativamente la longevidad de los ratones mutados frente a los ratones control, mediante una disminución de IGF-1 en suero y otros indicadores de esta vía de señalización (Kanfi et al., 2012). La SIRT3 parece mediar en algunos de los efectos beneficiosos de la DR sobre la longevidad (Someya et al., 2010), y otras como la SIRT4 y SIRT5, localizadas en la mitocondria, juegan un papel sobre la cadena transportadora que todavía no ha sido clarificado (Ahuja et al., 2007; Lopez-Otin et al., 2013).

### 5.2.2. Modelo AC5 KO

En el año 2007, Yan y colaboradores propusieron un nuevo modelo relacionado con la extensión genética de la longevidad, **mediante la creación de un ratón KO para la adenilato ciclasa tipo 5 (AC5), en el que la señalización  $\beta$ -adrenérgica se encuentra interrumpida promoviendo así un incremento de la longevidad media y máxima**, además de protección frente a cardiomiopatías, resistencia al estrés oxidativo inducido experimentalmente y disminución de la apoptosis de los miocitos cardiacos (Yan et al., 2007).

La adenilato ciclasa presenta 9 isoformas, siendo la tipo 5 la y la 6 las predominantes en tejido cardíaco (Gottle et al., 2009), aunque la AC6 se expresa preferentemente en tejidos cardíacos fetales. Así, la AC5 se encuentra sobre todo en corazón de individuos adultos y en algunas regiones del cerebro como el estriado (Ishikawa et al., 2005). Se activa mediante la unión de adrenalina o noradrenalina a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, lo que permite la formación de AMPc que estimula la actividad de la Proteína Kinasa A (PKA), que a su vez inhibe Raf-1 que no fosforila a la proteína ERK (*Extracellular regulated signal kinase*), como se detalla en la figura 14.



**Figura 15. Interrupción de la señalización β-AR en ratones AC5 KO.** La ausencia de la AC5 reduce la acumulación de AMPc lo que produce una disminución en la actividad de la PKA. Esto conlleva la pérdida de la inhibición sobre Raf-1, que activa la fosforilación de MEK y ERK. El atenolol es un fármaco β-1 bloqueante que inhibe la unión de la adrenalina al receptor. Las flechas indican los cambios que se esperarían en la vía de señalización por la pérdida de función de la AC5 o por la acción del fármaco atenolol. AC: Adenilato ciclasa; AMPc: AMP cíclico; PKA: Proteína quinasa A; ERK: *Extracellular signal-regulated kinase* (Modificado de Yan et al., 2007).

El sistema de acción (propuesto por los autores) en la extensión de la longevidad de los ratones AC5KO, consistiría en una estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK que de algún modo estaría induciendo una mayor resistencia al estrés oxidativo a través del incremento de la enzima MnSOD. Además el aumento de la actividad de p-ERK podría proteger frente al estrés oxidativo y la apoptosis (Yan et al., 2007).

Existen estudios que relacionan la vía de señalización Raf/MEK/ERK con el envejecimiento. Se ha demostrado que la activación de esta vía disminuye con la edad (Hutter et al., 2000; Lorenzini et al., 2002; Torres et al., 2003), y los niveles de p-ERK aumentan en modelos de ratones longevos como los Snell dwarf (Madsen et al., 2004) y los ratones sometidos a DR (Ikeyama et al., 2002).

De esta forma, sería posible reproducir los efectos beneficiosos sobre la longevidad vistos en este modelo, utilizando análogos farmacológicos capaces de inhibir la AC5 o el sistema  $\beta$ -adrenérgico mediante fármacos de uso común para tratar la hipertensión y el fallo cardiaco.

### 5.3. Manipulaciones farmacológicas

#### 5.3.1. Relacionadas con la vía Insulina/IGF-1, TOR y sirtuinas: Resveratrol, Metformina y Rapamicina

El **resveratrol** se identificó inicialmente en 2003 como una de las moléculas implicadas en la activación de la sirtuina 1 (SIRT1) (Howitz et al., 2003). Aunque es capaz de extender la longevidad en levaduras (Howitz et al., 2003), nematodos (Wood et al., 2004) y *D. melanogaster* (Bauer et al., 2004); este mismo efecto no se observó en otros laboratorios en los que se reprodujo en mismo experimento, lo que puede deberse al requerimiento de condiciones experimentales específicas (Kaeberlein et al., 2005a; Bass et al., 2007). Tampoco incrementó la longevidad en ratones, aunque si se observaron efectos beneficiosos frente a enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como patologías cardiovasculares y cáncer (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006; Sun et al., 2007; Pearson et al., 2008).

La **metformina** se comenzó a utilizar en el tratamiento de la diabetes tipo 2 detectando efectos similares a los obtenidos con DR (Bailey y Turner, 1996). La diana principal de este fármaco en hepatocitos es la proteína AMPK (Zhou et al., 2001), aunque un trabajo reciente indica que extiende la longevidad en *C.elegans* alterando el metabolismo de la metionina (Cabreiro et al., 2013). Es capaz de extender la longevidad en ratones susceptibles a desarrollar cáncer (Anisimov et al., 2003), ratones hipertensos (Anisimov et al., 2011) y en nematodos (Onken y Driscoll, 2010), pero no en ratas sanas (Smith et al., 2010), por lo que su papel como fármaco “*anti-aging*” no ha sido aclarado todavía.

La **rapamicina** se identificó en un principio como un antibiótico con actividad antifúngica cuya molécula diana es la proteína TOR. De todos los fármacos probados hasta la fecha, este es el único capaz de extender la longevidad media y máxima en



mamíferos (ratones) (Harrison et al., 2009), independientemente de la edad a la que se comience el tratamiento (Miller et al., 2011). Además este mismo efecto se consigue en levaduras (Kaeberlein et al., 2005b), *C. elegans* (Vellai et al., 2003) y *Drosophila* (Schieke et al., 2006) mediante la inactivación de la proteína TOR, que como se detalló en el apartado anterior de esta introducción, está directamente relacionada con el envejecimiento y es requerida para la extensión de la longevidad mediante la DR.

### 5.3.2. Relacionadas con el modelo AC5KO: Atenolol

El atenolol es un  $\beta$  bloqueante con una fuerte cardioselektividad por los receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos. Actúa controlando la tasa y fuerza de la contracción del corazón, reduciendo la presión sanguínea, por lo que ha sido utilizado durante años para tratar la hipertensión, enfermedades coronarias y arritmias (Baek et al., 2008; Berthonneche et al., 2009).

Todos los  $\beta$  bloqueantes muestran una afinidad altamente específica por los receptores  $\beta$  adrenérgicos ( $\beta$ -AR), inhibiendo la actividad simpática. Al unirse a los receptores  $\beta$ -AR, bloquean los efectos de la adrenalina sobre los mismos (Figura 15), de manera que se reducen los impulsos nerviosos que viajan a través del corazón reduciendo la frecuencia cardiaca, la contractilidad del miocardio y el gasto cardiaco (Meana y Garcia-Sevilla, 2003; Rehsia y Dhalla, 2010). Por ello, mejoran la supervivencia tras un infarto de miocardio y han sido utilizados como tratamiento en pacientes con fallo cardiaco e hipertensión durante décadas sin importantes efectos secundarios que afecten a la calidad de vida (Gottlieb et al., 1998; Milne y Hong, 2004).

Se ha visto que los niveles de los receptores  $\beta$ -AR y la estimulación de los mismos aumentan durante el proceso de envejecimiento, induciendo cardiomiopatías asociadas a la edad y acumulación lipídica en el hígado (Lakatta, 1993; Ghosh et al., 2012). Además se ha encontrado una relación entre la estimulación de la señalización  $\beta$ -AR y un incremento en la producción mitocondrial de ROS (Remondino et al., 2003; Andersson et al., 2011).

Además, en un estudio en el que se administró atenolol en el agua de bebida a ratones C57BL6 para determinar su efecto sobre el estrés oxidativo, se observó que

dicho tratamiento no modificó la producción mitocondrial de ROS ni el daño al ADN mitocondrial, sin embargo disminuyó fuertemente el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana. Estos cambios se traducen en una mayor resistencia de las membranas a la peroxidación lipídica, reflejado en los menores niveles de los marcadores de oxidación y lipoxidación proteica observados en los ratones tratados con atenolol, probablemente mediado por un aumento en la estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK (Sanchez-Roman et al., 2010).

## OBJETIVOS



La Teoría Mitocondrial de envejecimiento por Radicales Libres cuenta actualmente con un gran apoyo por parte de la comunidad científica, avalada por evidencias procedentes tanto de la Biología Experimental como de la Biología Comparada. Según las bases de esta teoría, y los datos procedentes de estudios comparados en especies tanto de aves como de mamíferos con diferentes longevidades, se concluye que, hasta la fecha, existen solamente dos factores que correlacionan en el sentido adecuado con la longevidad: una baja generación mitocondrial de radicales libres y un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos que componen las membranas. Estos dos parámetros hacen que se reduzca el daño oxidativo a otras macromoléculas celulares, como lípidos, proteínas y el ADN mitocondrial, lo que contribuiría a ir disminuyendo la tasa de envejecimiento (Pamplona y Barja, 2011).

Durante años, se ha intentado modificar estos parámetros con el fin de incrementar la longevidad máxima mejorando la calidad de vida y reduciendo la incidencia de enfermedades degenerativas. El primero de ellos, la producción mitocondrial de ROS, se ha conseguido disminuir de forma relativamente sencilla mediante manipulaciones en la dieta. De ellas la mejor conocida es la restricción de dieta (DR), capaz de incrementar la longevidad en todos los organismos estudiados, reduciendo la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADN mitocondrial (Gredilla y Barja, 2005). Con el fin de identificar que componente de la dieta era el responsable de estos efectos, y tras realizar diferentes experimentos, se concluyó que la restricción de un solo aminoácido, la metionina, era capaz de mimetizar los efectos de la DR sobre la producción mitocondrial de radicales libres (revisado en Sanchez-Roman y Barja, 2013a).

Además, se han llevado a cabo diferentes manipulaciones genéticas para incrementar la longevidad. Entre ellas, existe un nuevo modelo basado en la interrupción de la señalización  $\beta$ -adrenérgica mediante el bloqueo de la expresión génica de la adenilato ciclasa tipo 5 (AC5) en ratones AC5 *Knockout*, en el cual se produjo un aumento de la longevidad media y máxima inducido por la estimulación de la vía Raf/MEK/ERK (Yan et al., 2007). Para intentar mimetizar este modelo, en el presente estudio se procedió al bloqueo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica de manera

farmacológica mediante un bloqueante de los receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos: atenolol. Estos estudios se basaron en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, en los cuales tras 2 semanas de tratamiento en ratones C57BL/6, se vio que la administración del fármaco disminuyó el grado de insaturación de los lípidos de las membranas mitocondriales de corazón, disminuyendo el DBI, el PI y el daño oxidativo y lipoxidativo a proteínas. También aumentó los niveles de la proteína p-ERK demostrando que la vía se encontraba estimulada (Sanchez-Roman et al., 2010).

Así, el objetivo general de esta tesis sería determinar si manipulaciones experimentales como el tratamiento con atenolol, solo o en combinación con la restricción de metionina, así como la ausencia del gen Elov12, que codifica para la elongasa 2 de la vía de elongación de los ácidos grasos, pueden mejorar parámetros relacionados con el estrés oxidativo mitocondrial y la longevidad en mamíferos. Este objetivo general, pretende resolverse mediante diferentes objetivos concretos:

**OBJETIVO 1:** nos propusimos determinar si el efecto del atenolol a corto plazo (2 semanas) en ratones, se podía extrapolar a otras especies y a animales genéticamente heterogéneos (como la rata Wistar), ya que los ratones C57BL/6 son una cepa con características específicas y un genoma similar. Esto es importante sobre todo a la hora de intentar extrapolar esta manipulación a poblaciones humanas. Para ello, tras la administración del fármaco durante dos semanas se procedió a estudiar si el bloqueo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica era capaz de modificar la producción mitocondrial de ROS, el daño al ADN mitocondrial y a las proteínas, la insaturación de los ácidos grasos de las membranas (DBI, PI y actividades desaturasas y elongasas) así como la cantidad de complejos de la cadena respiratoria y de las proteínas SOD2, AIF, SIRT3 y SIRT5 en mitocondrias de corazón, principal órgano diana del atenolol.

**OBJETIVO 2:** como hemos dicho anteriormente, un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana está asociado a longevidades altas en diferentes especies, pero esta hipótesis no ha sido comprobada de forma experimental debido a la dificultad que conlleva modificar este parámetro. Aunque se ha conseguido reducir dicha insaturación a corto plazo mediante dietas ricas en grasas saturadas, esta manipulación a largo plazo sería perjudicial para los individuos experimentales debido

a los niveles poco saludables de lípidos en plasma que acarrearán, entre otros problemas, un aumento de los niveles de colesterol (Pamplona et al., 2004), poco apropiados para realizar estudios de longevidad.

Aunque esta hipótesis se confirma hasta cierto punto de manera experimental con un estudio llevado a cabo en *C. elegans* (Shmookler Reis et al., 2011), demostrando que la longevidad de gusanos longevos mutantes, similares genéticamente, correlaciona con el grado de insaturación de los ácidos grasos en el mismo sentido que en la comparación entre especies mencionada anteriormente (aumenta la longevidad al disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos), es necesario demostrar que ocurre lo mismo en mamíferos antes de establecer firmemente el concepto de que el bajo grado de insaturación de los ácidos grasos contribuye a la longevidad animal.

Por ello, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el objetivo 1 y en un trabajo previo en ratón (Sanchez-Roman et al., 2010), el segundo objetivo de esta tesis es poner a prueba si la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana mediante el bloqueo a largo plazo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica con el fármaco atenolol, es capaz de incrementar la longevidad máxima en ratones B6D2F1. Para ello se realizó una curva de supervivencia con 86 ratones, y se midieron los mismos parámetros relacionados con el estrés oxidativo citados en el objetivo anterior. Además, se estimaron parámetros fisiológicos como la temperatura rectal, la tasa metabólica, la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, y se llevaron a cabo estudios comportamentales, para determinar el estado de los animales tras la administración de atenolol durante 16 meses. Respecto a los estudios comportamentales, aunque se ha visto que el atenolol disminuye la ansiedad (Deary et al., 1991) y tiene efectos antidepresivos (Al-Tubuly et al., 2008), el impacto del tratamiento con este fármaco sobre el comportamiento no ha sido estudiado todavía. También se midieron parámetros inmunológicos, ya que aunque las células del sistema inmune expresan casi exclusivamente receptores  $\beta$ -2 (Sanders, 2012), se ha visto que la señalización  $\beta$ -1 adrenérgica podría modular de alguna manera la respuesta del sistema inmune (Emeny et al., 2007). Los parámetros bioquímicos se midieron en

corazón y músculo, ya que son tejidos vitales compuestos por células postmitóticas y los más afectados por el proceso endógeno de envejecimiento (Dai et al., 2012).

**OBJETIVO 3:** viendo los efectos beneficiosos del atenolol en parámetros relacionados con el estrés oxidativo obtenidos en los objetivos 1 y 2, de la restricción de metionina en la dieta (Sanchez-Roman y Barja, 2013b), y basándonos en trabajos previos en los que se evaluó la acción conjunta de ambos tratamientos en corazón de rata (Sanchez-Roman et al., 2013), decidimos evaluar los efectos que producen el tratamiento con atenolol, la restricción de metionina y los dos tratamientos simultáneamente durante 7 semanas sobre el estrés oxidativo y el envejecimiento en hígado de rata Wistar. Aunque en el trabajo realizado en corazón la administración del fármaco aumentó la producción mitocondrial de ROS, esta fue revertida tras el tratamiento conjunto, que a su vez fue capaz de disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas en mayor medida que ambos tratamientos por separado, así como de incrementar la cantidad de proteína p-ERK.

Sin embargo, en la presente tesis, el estudio se realizó en hígado, que además de ser el órgano más sensible a cambios metabólicos y nutricionales, no es la diana principal del fármaco, de manera que los datos obtenidos nos permitirán determinar si los efectos beneficiosos del atenolol se producen solo en tejidos específicos sometidos de manera directa a la acción  $\beta$ -adrenérgica, o si por el contrario se pueden extender al organismo en general, y si la interacción con la MetR puede potenciar o inhibir dichos efectos. Para ello se estudiaron parámetros mitocondriales como la producción de ROS, el consumo de oxígeno y la fuga de radicales libres, el daño al ADN mitocondrial, parámetros relacionados con los ácidos grasos (DBI, PI, ACL, estimación de las actividades desaturasa y elongasa) y con proteínas (cantidad de complejos de la cadena respiratoria, AIF, el ratio MAPK/p-MAPK y el daño oxidativo a proteínas mediante marcadores específicos).

**OBJETIVO 4:** debido a la importancia que tiene el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas en la longevidad animal (Naudi et al., 2013b) y a las dificultades que conlleva modificar este parámetro sin riesgos para la salud, se planteó cambiar el perfil lipídico mediante la creación de un ratón Knockout para el gen Elov12,



que codifica para una de las enzimas elongasas (concretamente para la ELOVL2) que interviene en la elongación de los PUFAs (Zadravec et al., 2011). De este modo se determinaron los efectos que produce la ausencia de este gen, y por lo tanto el bloqueo en un punto concreto de la ruta de síntesis de los diferentes tipos de ácidos grasos, sobre el perfil lipídico (composición lipídica, BDI, PI, ACL y actividades desaturasa/elongasa), la función mitocondrial (en presencia de diferentes sustratos e inhibidores) y el estrés oxidativo (daño oxidativo a proteínas).

Ya que el papel de la generación mitocondrial de ROS sobre la longevidad animal ha sido demostrado experimentalmente en numerosas ocasiones [revisado en (Barja, 2004a)], **la presente tesis doctoral pretende poner a prueba, por primera vez, el segundo de los factores que correlacionan con la longevidad en las diferentes especies animales: el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas.** Para ello se han utilizado diferentes tipos de manipulaciones experimentales tanto farmacológicas, como dietéticas y genéticas, contribuyendo así a comprender como actúan todas ellas sobre el proceso de envejecimiento con la esperanza de poder ser aplicadas a la población humana, para así lograr aumentar la longevidad máxima manteniendo una buena calidad de vida y retrasando la aparición de enfermedades degenerativas asociadas a la edad.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## Diseño Experimental

### 1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ATENOLOL EN PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL ENVEJECIMIENTO

- **Modelo 1.1. Efecto agudo del atenolol en corazón de rata Wistar**

- **Grupos experimentales**

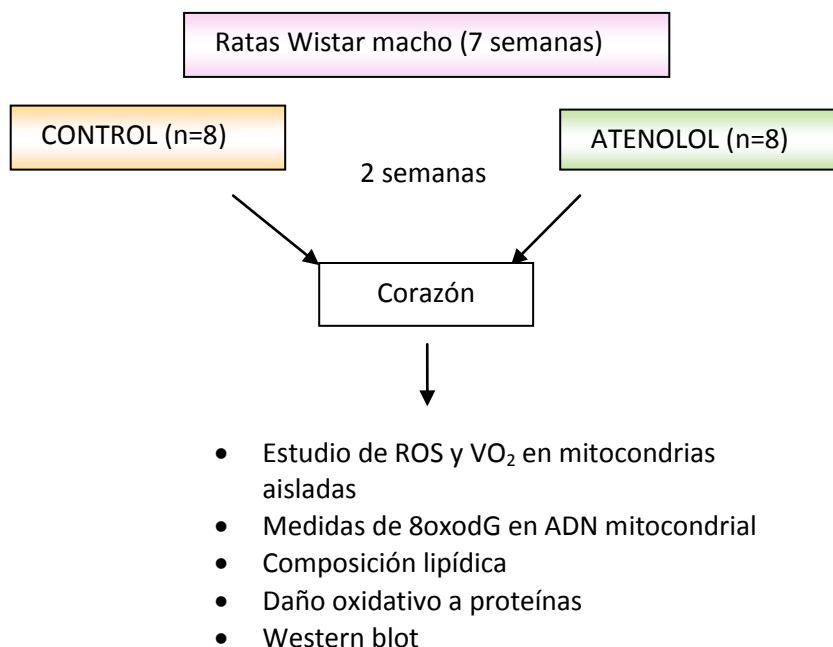
En este experimento se utilizaron 16 ratas Wistar macho (*Rattus norvegicus*) de 6-7 semanas que fueron repartidas de manera aleatoria en dos grupos uniformes en cuanto al peso medio de sus individuos:

1. Control
2. Atenolol

- **Tratamiento**

Los animales fueron estabulados en jaulas individuales, y tras una semana de aclimatación, se inició el tratamiento con el fármaco atenolol disuelto en el agua de bebida a una concentración de 1g/l. La duración de este tratamiento fue de dos semanas, y en este tiempo los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida (tanto en el grupo control como en el grupo tratado con atenolol) que se midió y controló durante todo el periodo experimental con el fin de descartar que la administración del fármaco pudiese modificar la cantidad de agua que bebe el animal. La ingesta de los animales fue controlada también durante esas dos semanas comprobando la ausencia de diferencias entre grupos. El peso de los animales se controló semanalmente desde su llegada al animalario hasta el día de su sacrificio.

**Figura 16.** Diseño experimental (Objetivo 1).



- **Modelo 1.2. Efecto crónico del atenolol en corazón y músculo de ratones B6D2F1 durante todo el ciclo vital.**

- **Grupos experimentales**

En este experimento se utilizaron 134 ratones macho B6D2F1 (resultantes del cruce de hembras C57BL/6 x machos DBA/2) de dos meses de edad. Los animales fueron distribuidos en dos grupos:

1. Control

2. Atenolol

86 de estos animales (43 control y 43 atenolol) fueron separados desde el principio para los estudios de longevidad, permaneciendo en condiciones estándar durante toda su vida a excepción del tratamiento con atenolol, que en este caso se administró diluido en el agua de bebida a una concentración final de 0,1 g/l.

Un grupo separado de 48 animales (24 control y 24 atenolol) se estableció desde un primer momento para llevar a cabo la valoración de diferentes parámetros

bioquímicos y fisiológicos una vez alcanzada la vejez (16-18 meses). A ellos se unió un tercer grupo de ratones jóvenes adultos (6 meses de edad), como segundo control:

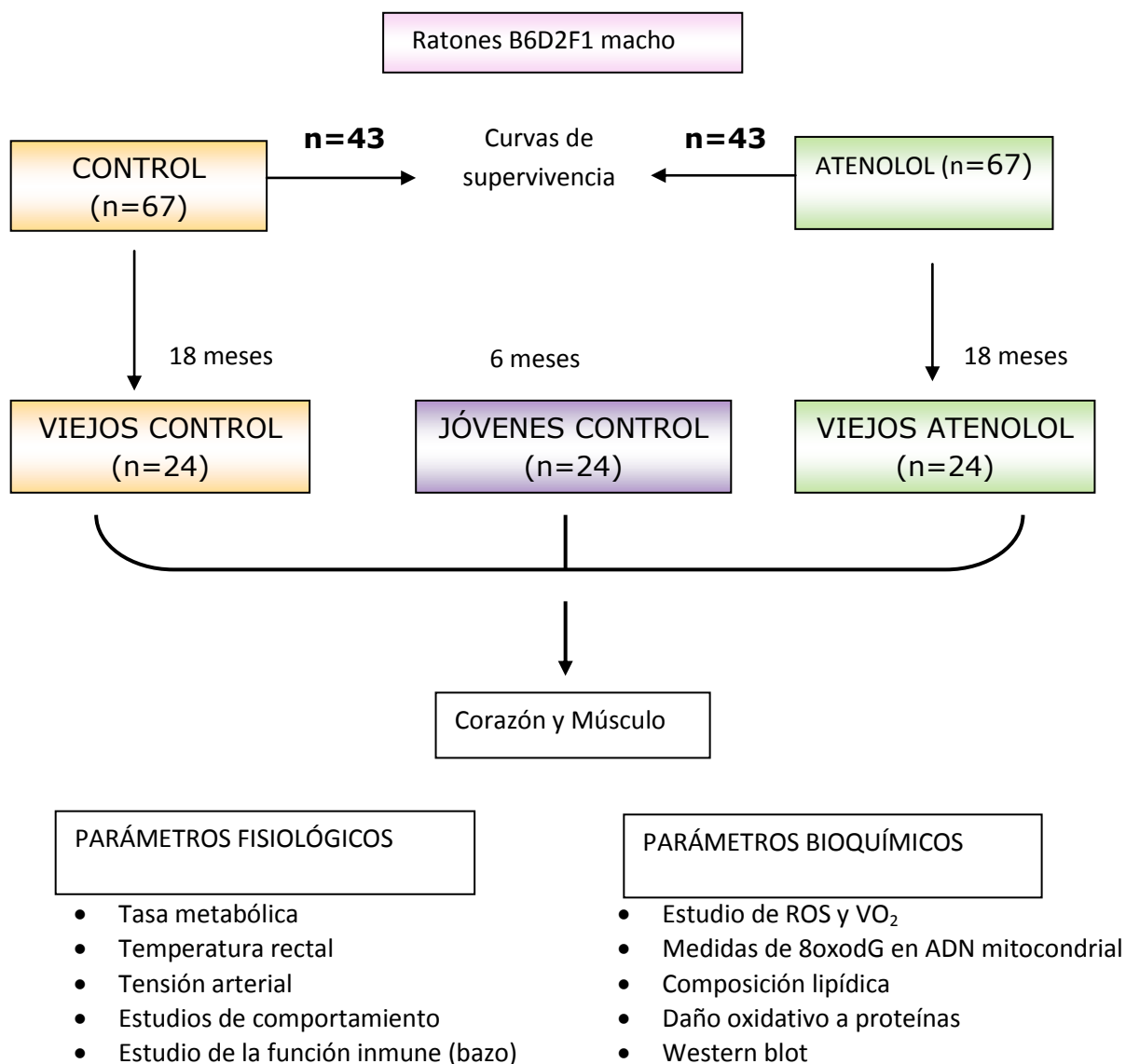
1. Jóvenes control
2. Viejos control
3. Viejos tratados con atenolol

De cada grupo de 24 animales (control y tratados con atenolol), 8 animales se utilizaron para obtener muestras de corazón y músculo para análisis en mitocondrias aisladas, 8 para las medidas de 8-oxodG y los 8 restantes para los demás parámetros bioquímicos estudiados tras su sacrificio por dislocación cervical.

#### ▪ **Tratamiento**

Los animales fueron estabulados en jaulas individuales, y tras unas semanas de aclimatación, se inició el tratamiento con el fármaco atenolol (a los 2 meses de edad). En este caso el tratamiento con el fármaco se extendió durante toda la vida del animal, bien hasta el momento del sacrificio o la muerte natural en el caso de los animales destinados a la elaboración de las curvas de supervivencia. En este tiempo los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida (tanto en el grupo control como en el grupo tratado con atenolol) y la ingesta se controló con el fin de descartar diferencias debidas a la restricción calórica. El peso de los animales se controló semanalmente desde su llegada al animalario hasta el día de su sacrificio.

**Figura 17.** Diseño experimental (Objetivo 2).



## 2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA Y EL TRATAMIENTO A MEDIO PLAZO CON ATENOLOL EN HÍGADO DE RATA WISTAR.

### ▪ Grupos experimentales

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 32 ratas Wistar macho (*Rattus norvegicus*) de 6-7 semanas de edad repartidas en cuatro grupos homogéneos en cuanto al peso medio de sus individuos:

1. Control
2. Restringido en Metionina al 40% (MetR)
3. Tratados con atenolol (AT)



4. Restringido en metionina al 40% y tratados con atenolol (MetR+ AT)

▪ **Tratamiento**

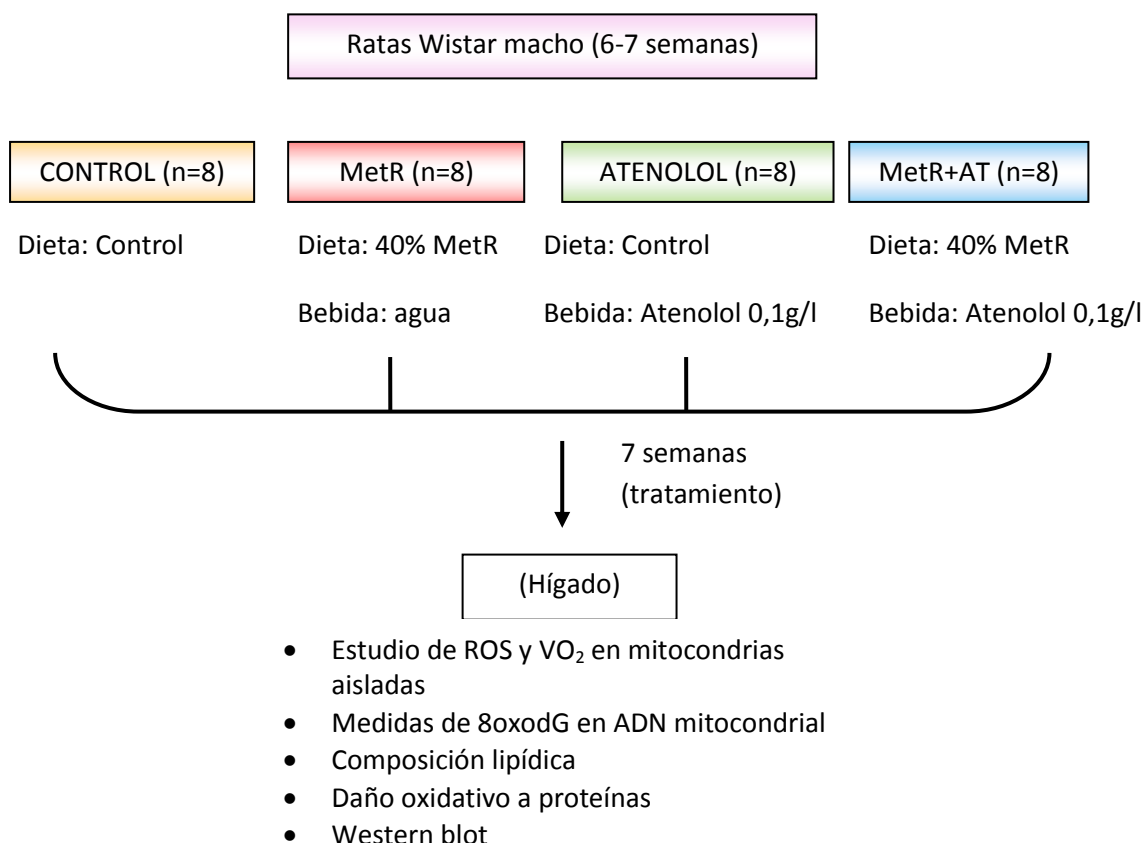
Los animales fueron estabulados en jaulas individuales, y tras una semana de aclimatación, se inició el tratamiento con el fármaco atenolol y dietas semipurificadas preparadas por MP biochemicals (Irvine, USA) e importadas por MP Biolink (Barcelona). La duración de este tratamiento fue de siete semanas, y en este tiempo los animales de los grupos AT y MetR+AT tuvieron libre acceso a una solución de 0,1 g/l de atenolol en el agua de bebida. Los animales de los grupos Control y MetR tuvieron también libre acceso al agua de bebida sin atenolol, controlándose en ambos casos la cantidad bebida para poder descartar diferencias entre grupos. Por otro lado, los animales de los grupos Control y AT fueron alimentados con dieta control, mientras que los animales de los grupos MetR y MetR+AT fueron alimentados con dieta restringida en metionina. El contenido de este aminoácido se redujo en un 40% respecto al de la dieta control (0,86% en metionina). El descenso de metionina de la dieta del grupo restringido (0,34% en términos absolutos) se compensó con un aumento conjunto de un 0,34% en todos los demás componentes de la dieta, distribuido en proporción a su presencia porcentual en dicha dieta. Con este procedimiento el contenido en todos los componentes de la dieta, exceptuando la metionina, fue prácticamente idéntico en las dos dietas experimentales. La composición exacta de ambas dietas se muestra en la tabla 1.

El tiempo de restricción de metionina fue de 7 semanas. Para evitar diferencias en la ingesta entre grupos, se utilizó el método del “pair feeding”, que consiste en pesar diariamente la comida y suministrar a todos los grupos la cantidad correspondiente a la media de la ingesta del grupo que menos comió, que fue el MetR.

**Tabla 1.** Dietas control y restringida en metionina al 40% (RMet).

Componente	Control (g / 100g)	RMet (g / 100g)
L-Arginina	1,12	1,124
L-Lisina	1,44	1,445
L-Histidina	0,33	0,331
L-Leucina	1,11	1,114
L-Isoleucina	0,82	0,823
L-Valina	0,82	0,823
L-Treonina	0,82	0,823
L-Triptófano	0,18	0,181
<b>L-Metionina</b>	<b>0,86</b>	<b>0,516</b>
Acido L-glutámico	2,70	2,709
L-Fenilalanina	1,16	1,164
L-Glicina	2,33	2,338
Dextrina	5,00	5,017
Almidón de maíz	31,80	31,93
Sacarosa	31,80	31,93
Celulosa no nutritiva	5,0	5,017
Bitartrato de colina	0,2	0,201
Mezcla de vitaminas AIN 93G	1,0	1,003
Mezcla de minerales AIN 93G	3,5	3,512
Aceite de maíz	8,0	8,028
Total	100	100

**Figura 18.** Diseño experimental (Objetivo 3).



### 3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATONES ELOVL2 KO.

#### ▪ Grupos experimentales

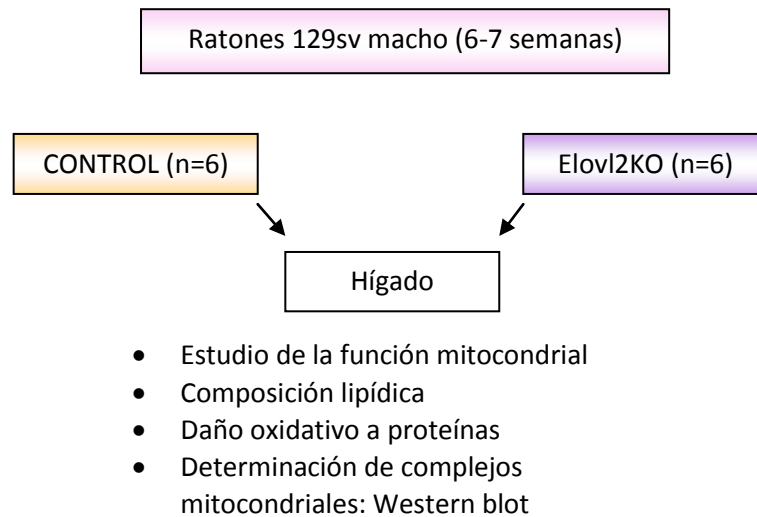
En este experimento se utilizaron 6 ratones control macho de la cepa 129Sv (“wild type”, WT) y 6 ratones “Knocked out” para el gen que codifica la enzima elongasa Elovl2 (Elovl2KO), generados como se describe en (Zadravec et al., 2011) y mantenidos por retrocruzamientos en la misma cepa durante 10 generaciones. Todos los animales tenían 6-7 semanas de edad en el momento del sacrificio.

#### ▪ Tratamiento

Los animales fueron marcados con uno o varios agujeros en la oreja para poder identificarlos. En este caso los animales no fueron estabulados individualmente ya que no se requirió un control de la ingesta ni del agua de bebida que fue *ad libitum*.

Simplemente se mantuvo a los animales intactos hasta que alcanzaron las 6-7 semanas de edad, momento en que fueron sacrificados por dislocación cervical para obtener el hígado.

**Figura 19.** Diseño experimental (Objetivo 4).



## Material es

### 1. EQUIPO INSTRUMENTAL

- Agitador magnético P SELECTA Agimatic E 7002431.
- Agitador Vortex P SELECTA Heidolph reax 2000.
- Balanza de precisión GILBERTINI CRYSTAL 200 CAL, 141190.
- Balanza electrónica Gram ST-3100.
- Bomba para HPLC Gilson 305 Pump con Modulo Manometrico 805.
- Cabina de flujo laminar vertical (TELSTAR, AV-100)
- Campana de extracción.
- Centrífuga modelo 5702R, Eppendorff.
- Centrífuga refrigerada SORBALL INSTRUMENTS RC5C GIRAL.
- Centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge 1S-R.
- Columna de HPLC mediterranea sea18 5  $\mu\text{m}$  25X0.46 TEKNOKROMA.
- Columna capilar SP2330 30 m x 0,25mm x 0,20  $\mu\text{m}$ .
- Columna capilar 30 m HP-5MS 30 m x 0,25mm x 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Columna de intercambio iónico DOWEX-50W.
- Columna de extracción en fase sólida C-18 de 1 ml (SUPELCO, Bellefonte, PA).
- Columna C18 de fase reversa (Luna 3n pFp(2), 100A, 150 x 2mm ID, Phenomenex, CA, USA).
- Congelador de -80 °C PREMIUM U-410, Durviz.
- Contador Beta.
- Contador de células manual
- Cromatógrafo de gas HEWLETT-PACKARD 6890 Serie II.
- Cubeta capilar de cuarzo de 0,5 nm (Biochrom).
- Detector electroquímico Coulochem II ESA.
- Detector multigás DRÄGER.
- Detector UV para HPLC BIORAD UV-1806.
- Electrodo y medidor de oxígeno ESD modelo 600 HANSATECH.
- Electrodo y medidor de oxígeno tipo Clark (Yellow Springs Instrument)
- Equipo ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Barcelona, España)
- Espectrofotómetro MILTON ROY Spectronic 601-C.
- Espectrómetro de masas HEWLETT-PACKARD 5973A.
- Evaporador N-evap Model 111 (Organomation Assoc. Inc.)
- Filtros de nitrocelulosa (296-TSTP01300, MILLIPORE).
- Filtros para recoger células (0310-3924, SKATRON INSTRUMENTS)
- Filtros de nylon 0,45  $\mu\text{m}$ , 47 mm MILLIPORE.
- Fluorímetro PERKIN ELMER LS 50B.
- GeneQuant (Amersham Biociences).
- Hemocitómetro de Neubauer (BLAU BRAND).
- Homogenizador mecánico WHEATON INSTRUMENTS.
- Homogeneizadores vidrio-teflón de 5 ml POBEL.
- Homogeneizadores vidrio-teflón de 2 ml POBEL.
- Horno de columna Eppendorf CH-500.
- Microcentrífuga BIOFUGE 13 HERAEUS.
- Microscopio óptico (NIKON)
- Mili Q Gradient A10 Milipak 40, MILLIPORE.
- Multiagitador magnético con placa térmica SBS A-08.
- pH/mV-metro CRISON BASIC 20.
- Pipetas automáticas GILSON de 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , y 1000  $\mu\text{l}$ .
- Placa Térmica P SELECTA S INVESTER.
- Programa de integración GILSON.
- Programa Statgraphics Plus 4.0.
- Programa de control del electrodo de oxígeno Oxygraph v1.15.

- Recolector semiautomático de células (SKATRON INSTRUMENTS)
- Respirómetro 2,600 ml
- RiOs 8. MILLIPORE.
- Sistema manométrico para medidas de tensión sanguínea con brazalete en la cola, LE5001 Panlab Harvard Apparatus.
- Software de procesamiento "3D object counter" plug-in.
- Sonda rectal RET 1 PHYSITEMP INSTRUMENTS.
- Tamiz de malla (Sigma, St.Louis and USA).
- Termómetro COLE&PARMER, modelo 8112-20
- Termostatizador con agitación MEMMERT.
- Termostatizador P SELECTA tectron 3000543.
- Tubos Whatman 0,22 µm de diámetro de poro MILLIPORE.
- Vibrador de brazo oscilante Vibromatic-384

## 2. PRODUCTOS QUÍMICOS

- Atenolol (Sigma, A-7655)
- 2'-deoxiguanosina (Sigma, D-7145)
- 4',6-diamidina-2-fenilindola (DAPI, Boehringer Mannheim, 236276).
- 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (Sigma, H-5653).
- Acetato potásico (Sigma, P-5708).
- Acetato sódico (Sigma, S-2889).
- Acetonitrilo (Panreac, 221881).
- Ácido acético glacial (Panreac, 141008).
- Ácido clorhídrico (Merck, K35739817 608).
- Ácido fosfórico (Merck, K29868563 146).
- Ácido glutámico (Sigma, G-1376).
- Ácido homovanílico (Sigma, H-1252).
- Ácido fítico (Sigma, P-8810).
- Ácido málico (Sigma, M-9138).
- Ácido succínico (Fluka Chemie GmbH, 14079).
- Ácido tricloroacético (Panreac, 252373).
- Adenosina 5'-difosfato, ADP (Sigma, A-2754).
- S-Adenosil-L-metionina (Sigma, A7007).
- S-Adenosil-L-homocisteína (Sigma, A9384).
- Agua HPLC (Scharlau, AG-0001).
- Albúmina sérica bovina (Sigma, A-7030).
- Alcohol isoamilo (Merck, K22601379 604).
- Antidigoxigenina de ratón (Boehringer Mannheim, 1333062).
- Anticuerpo anti-mouse conjugado con fluoresceína isothiocinato (FITC) (Boehringer Mannheim 124616).
- Anticuerpo anti-NDUFS3 de Complejo I mitocondrial (1:1000, Molecular Probes A-21343).
- Anticuerpo anti-NDUFA9 de Complejo I mitocondrial (1:1000, Molecular Probes A-21344).
- Anticuerpo anti-subunidad de 70 kDa de Complejo II mitocondrial (1:500, Molecular Probes, A-11142).
- Anticuerpo anti-proteína ferro-sulfurada de Rieske de Complejo III mitocondrial (1:1000, Molecular Probes A-21346).
- Anticuerpo anti- subunidad II del núcleo de Complejo III mitocondrial (1:1000, Molecular Probes A-11143).
- Anticuerpo anti-subunidad 1 de Complejo IV mitocondrial (1:1000, Molecular Probes A-6403).
- Anticuerpo anti-AIF (1:1000, Sigma A-7549).
- Anticuerpo anti-SITR1 (1:100, Abcam AB-28170)
- Anticuerpo anti-PGC1 (1:100, Cayman 101707)
- Anticuerpo anti-Nrf2, (1:200, Santa Cruz Biotechnology SC-722)

- Anticuerpo anti-TFAM (1:500, BioVision 3885)
- Anticuerpo anti-phospho-ERK1/2 (1:500, Cell Signaling Technology 4370)
- Anticuerpo anti-ERK1/2 (1:500, Cell Signaling Technology 4695)
- Anticuerpo anti-Porina mitocondrial (1:15000, Molecular probes A-31855)
- Anticuerpo anti-Tubulina (1:15000, Abcam ab-7291)
- Anticuerpo anti-Oxphos (1:10000, Mitosciences, OR, USA, MS601)
- Anticuerpo anti-COX4 (1:2000, Santa Cruz Laboratories, sc-58348)
- Anticuerpo anti-ATP5A (1:2000, Life Technologies, A21305)
- Anticuerpo anti-mitoNEET (1:5000, Proteintech, 16006-1-AP)
- Antimicina A de *Streptomyces* sp. (Sigma, A-8674).
- Azul tripán (Sigam-Aldrich, T-8154)
- Biotina-16-dUTP (Boehringer Mannheim, 1093070000).
- Carbonil cianido p-trifluorometoxifenilhidrazona, FCCP (Sigma, C2920)
- Cloroformo (Panreac, 141252 1612).
- Cloruro de magnesio (Sigma M-8266).
- Cloruro de zinc (Merck, B286816 909).
- Cloruro potásico (Sigma, P-9333).
- Colagenasa A (Roche, 103586).
- d5-2,3,3,4,4-L-glutámico 98 % d min (Isotec).
- Dieta de mantenimiento para roedores (Panlab, A04).
- Dietas semipurificadas (MP biochemicals).
- D-L-lisina-4,4,5,5-d4•2HCl 98 % min. (Isotec)
- Dodecilsulfato sódico (Sigma, L-4509).
- EDTA-Na2 (Sigma, E-1644).
- EGTA (Sigma, E-4378).
- ECL kit (GE Healthcare Life Sciences).
- Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Sigma, P-5521).
- Fosfato dipotásico (Panreac, 141512).
- Fosfato monopotásico (Panreac, 141509).
- Gentamicina (Sigma, P11-004)
- Glicina (Sigma, G-7126).
- Glucosa (Sigma, G-8270).
- Glucosa oxidasa (Sigma, G-0543).
- Concanavalina A (Sigma, C-5275)
- Helio (Carburos metálicos).
- Hepes (Sigma, H-3375).
- Hidrato de Colato sódico (Sigma, C-1254).
- Hidróxido sódico (Sigma, S8045).
- Histopaque de densidade 1,077g/ml (Sigma, 10771)
- Homocisteína (Sigma, H4628).
- Isopropanol (Sigma, 34863).
- Lipopolisacárido (LSP) (Sigma, L-4516).
- Manitol (Sigma, M-4125).
- Malondialdehído (Sigma, 63287).
- Medio RPMI 1640 (E15-842).
- Metanol (Panreac, 361091).
- Nebivolol (Sigma, N-1915).
- Nitrógeno (Air liquid).
- Nucleasa P1 de *Penicillium citrinum* (Sigma, N8630).
- Oligomicina (Sigma, O4876).
- Perclorato sódico (Merck, A699864 614).
- Peroxidasa de rábano (Sigma, P-8250).
- Piruvato sódico (Sigma, P-8574).
- Proteasa. Subtilisina A, Tipo VIII: Bacteriana de *Bacilo licheniformis* (Sigma, P5380).
- Quimioatrayente fMet-Leu-Phe (Sigma, F-3506).
- RNAsa de páncreas bovino (Roche, 10 109 126 001).
- Rotenona (Sigma, R-8875).

- Sacarosa (Sigma, S-9378).
- Suero fetal bovino (Sigma, A15-003)
- Sulfato de cobre (II) (Sigma, 1297).
- Superóxido dismutasa (Sigma, S-7571).
- Sustrato quimioluminiscente de la HRP (Millipore, MA, USA).
- Timidina 1mCi, 1ml (MP, 2405901).
- Tris (Sigma, T-6791).
- Vaselina (Panreac, 211757.1207).

### 3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: MANTENIMIENTO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para los estudios 1 y 2 se utilizaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), o ratones (*Mus Musculus*) de la cepa B6D2F1, ambos suministrados por Harlam.

Estos animales fueron estabulados individualmente y se mantuvieron en condiciones SPF bien en el animalario de la UCM (**Estudio1, Modelo 1.2.**), bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), humedad relativa ( $50\% \pm 10\%$ ) y ciclo invertido luz:oscuridad (12:12 horas).

Para el **estudio 3** se emplearon ratones ELOVL2KO procedentes de la cepa 129/Sv que se obtuvieron según se describe en (Zadravec et al., 2011) y ratones control 129/Sv, ambos suministrados por el animalario del departamento de Fisiología de la Universidad de Estocolmo. Estos animales no se estabularon individualmente, ya que no fue necesario controlar la ingesta ni el agua de bebida, pero fueron marcados con una o varias muescas en la oreja para su identificación. Todos ellos se mantuvieron también en condiciones SPF, con una temperatura de 24 °C y ciclo invertido luz:oscuridad (12:12 horas).

Todos los animales contaban con 7-8 semanas de edad al inicio de la experimentación, tras al menos una semana de aclimatación desde su llegada, excepto en el caso de los ratones del **estudio1, modelo 1.2.**, que contaban con 2 meses de edad cuando se inició el tratamiento. Todos ellos se pesaron a su llegada al animalario y semanalmente durante el periodo experimental. El agua de bebida fue suministrada *ad libitum* y medida semanalmente. La comida fue administrada diariamente a la misma hora.



Para evitar los efectos depresores de los anestésicos sobre el grado de acoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, todos los animales se sacrificaron sin emplear para ello ningún tipo de anestesia, por decapitación en el caso de las ratas, y por dislocación cervical en el de los ratones, transcurrido el tiempo necesario para cada tipo de tratamiento. Tras el sacrificio, los diferentes tejidos elegidos para cada estudio se procesaron inmediatamente para medir la respiración mitocondrial y la producción mitocondrial de ROS, congelándose una proporción de los mismos en nitrógeno líquido y manteniéndolos a -80 °C para el ensayo de los restantes parámetros bioquímicos.

## Métodos analíticos

### 1. PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE ROS, CONSUMO DE OXÍGENO Y FUGA DE RADICALES LIBRES

#### **1.1. Aislamiento de mitocondrias funcionales de:**

##### ***-Corazón y músculo***

Para aislar mitocondrias funcionales de corazón (Estudio 1. Modelos 1.1. y 1.2.) y músculo (Estudio 1. Modelo 1.2.), tras sacrificar al animal se extrajo el corazón (o el músculo) y después de pesarlo, se procesó siguiendo el protocolo descrito por Mela y Seitz (Mela y Seitz, 1979) con modificaciones. Tras extraer el tejido correspondiente en cada caso, se depositó en medio de aislamiento (Manitol 220 mM, Sacarosa 70 mM, Tris 10 mM, EDTA 1mM, a pH 7,4) frío y se trocó en fragmentos pequeños.

Se homogeneizó (émbolo flojo vidrio-vidrio) en 10 ml de medio de aislamiento con 5 mg de proteasa, (Subtilisina A Tipo VIII) (para liberar las mitocondrias de las miofibrillas musculares) y 25 mg de albúmina. Tras 1 min, se añadieron 25 ml más de medio de aislamiento con 25 mg de albúmina y se homogeneizó con émbolo ajustado. A continuación se centrifugó a 700g durante 10 minutos a 4 °C y se descartó el sedimento, eliminando así los núcleos y restos de membrana. El sobrenadante se centrifugó a 8.000 g durante 10 minutos a 4 °C precipitando las mitocondrias. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en 0,5 ml de medio de aislamiento, obteniendo la suspensión mitocondrial. Todos los procesos descritos se

realizaron en frío (a 4 °C), y se pueden observar en la Figura 20a. En el caso del aislamiento de mitocondrias de corazón de ratón (Estudio 1. Modelo 1.2.), todos los volúmenes se redujeron a la mitad.

#### **- Hígado**

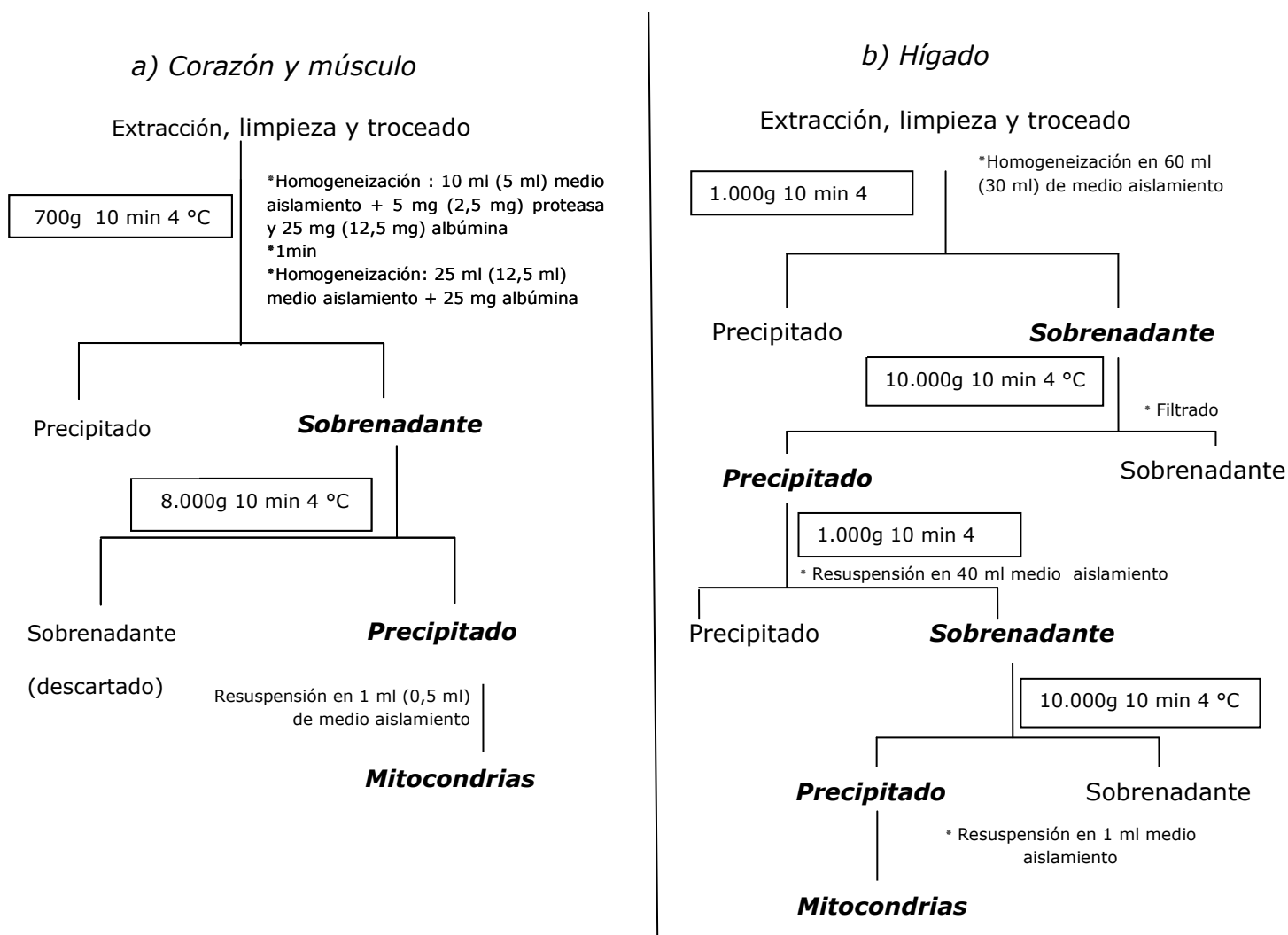
Para aislar mitocondrias funcionales a partir de hígado de rata y ratón (Estudios 2 y 3), dicho órgano se procesó de inmediato tras el sacrificio del animal según el método descrito en (Gredilla et al., 2001a) (Figura 20b).

De este modo, el hígado se extrajo y se depositó en medio de aislamiento con EDTA (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, Hepes 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,35) frío, donde se aclaró bien para quitar la grasa de alrededor y se troceó.

Posteriormente se homogeneizó en 60 ml del mismo medio de aislamiento para ser centrifugado a 1.000g durante 10 minutos y eliminar, de esta forma, los núcleos y restos celulares junto con el pellet. A continuación se filtraron los sobrenadantes a través de una malla a otros tubos y se centrifugaron de nuevo a 10.000g otros 10 minutos. Se eliminaron tanto el sobrenadante como la grasa que quedó en las paredes de los tubos, y los pellets se resuspendieron en 40 ml del mismo medio de aislamiento pero sin EDTA. Se llevó a cabo otra centrifugación de 10 minutos de duración a 1.000g, el sobrenadante se pasó a otro tubo y se centrifugó otros 10 minutos a 10.000g. Finalmente, el pellet mitocondrial obtenido se resuspendió en 1 ml (0,5 ml en hígado de ratón) de medio de aislamiento (sin EDTA). Todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C.

**Figura 20.** Aislamiento de mitocondrias a partir de: a) Corazón y músculo de rata y ratón (Mela y Seitz, 1979); b) Hígado y riñón de rata y ratón (Gredilla et al., 2001a).

# ASLAMIENTO DE MITOCONDRIAS



Todos los procedimientos descritos se llevaron a cabo en frío (4 °C).

En el caso de aislamiento de mitocondrias de corazón y músculo, entre paréntesis aparecen los volúmenes y pesos que se utilizaron para ratón, ya que la cantidad de tejido de la que disponíamos era menor que en el caso de la rata.

### 1.2. Valoración de proteína mitocondrial

Tras obtener la suspensión de mitocondrias a partir de los diferentes órganos, se procedió a cuantificar la proteína mitocondrial por el método de Biuret, según Gornall y colaboradores (Gornall et al., 1949). Es una técnica colorimétrica en la que la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de proteína. El sulfato cúprico proporciona el color al unirse específicamente a los enlaces peptídicos que quedan expuestos tras la desnaturalización producida por el colato sódico. El hidróxido sódico se añade para proporcionar un medio con pH alcalino, necesario para la formación de los complejos proteína-Cu.

El ensayo se realizó con un blanco y cuatro estándares de 0,25; 0,5; 0,1 y 0,2 mg de proteína generados a partir de una solución madre de albúmina sérica bovina (BSA) de 10 mg/ml (Tabla 2). Los tubos de muestra contenían 40 µl de suspensión mitocondrial y 460 µl de agua destilada. A cada tubo se le añadieron: Na-colato al 4 %, NaOH al 10% y CuSO<sub>4</sub> al 1% en los volúmenes indicados en la Tabla 1. Tras ser agitados, se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro.

**Tabla 2:** Composición de los tubos a ensayar.

	Blanco	Estándar 1 (0,25mg)	Estándar 2 (0,5mg)	Estándar 3 (0,1mg)	Estándar 4 (0,2mg)	Muestra (duplicado)
Agua destilada (µl)	500	475	450	400	300	460
Solución de BSA (µl)	0	25	50	100	200	0
Suspensión mitocondrial (µl)	0	0	0	0	0	40
Na-Colato (µl)	200	200	200	200	200	200
NaOH (ml)	2	2	2	2	2	2
CuSO <sub>4</sub> (µl)	300	300	300	300	300	300

A partir de los datos de los estándares se construyó la siguiente recta de regresión, que se utilizó para el cálculo de las concentraciones proteicas:

Donde:

$$\text{mg de proteína} = \frac{\text{DO} - a}{b}$$

a = punto de intersección con el eje de las X.

b = pendiente de la recta de regresión.

La recta patrón se repitió cada día, comprobándose que el coeficiente de regresión fuese cercano a 0,9999 y se calculó la concentración de proteína mitocondrial con la media de la absorbancia de los duplicados de cada muestra.

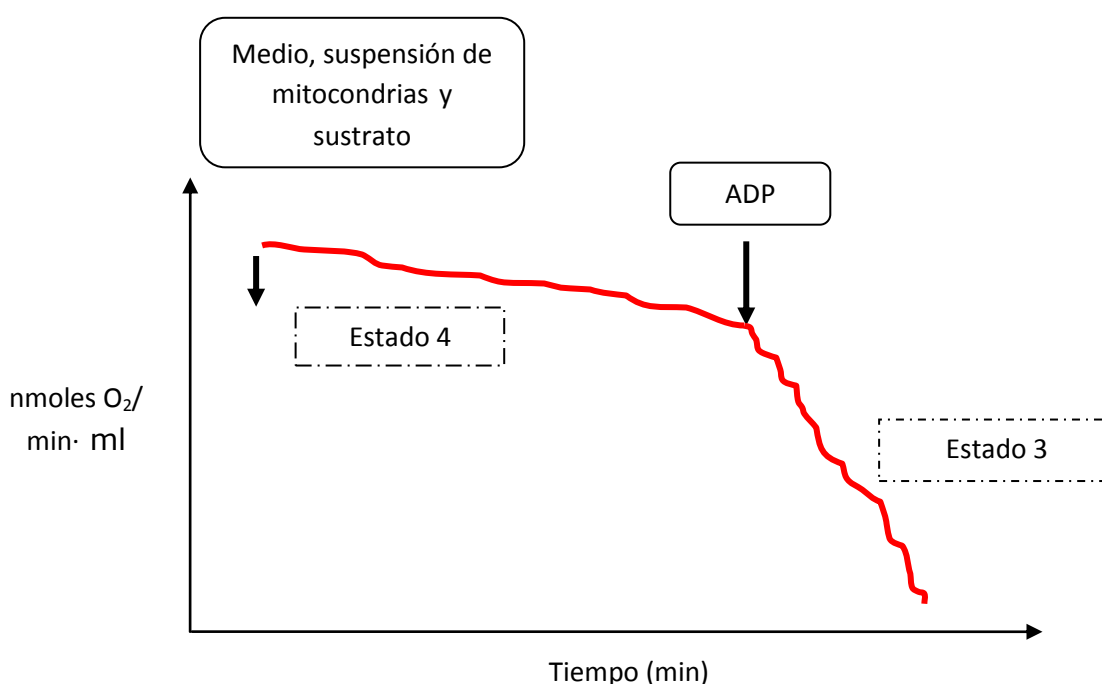
### **1.3. Consumo de oxígeno mitocondrial**

Las medidas de consumo de oxígeno mitocondrial se realizaron a 37 °C mediante un electrodo de oxígeno tipo Clark controlado por ordenador. Este electrodo consiste en un cátodo de platino que se mantiene a un potencial de -0,7 mV con respecto a un cátodo de Ag-AgCl, empleado como referencia. El electrodo está recubierto por una fina membrana de polietileno permeable al oxígeno. Durante el ensayo, el oxígeno presente en la mezcla de reacción adyacente a la superficie del cátodo se reduce a agua, dando lugar a un gradiente de difusión entre el electrodo y la mezcla de reacción. Sin embargo sólo una pequeña proporción de oxígeno presente en el medio de reacción es consumido por el cátodo, siendo la mayor parte de éste utilizado por las mitocondrias. La membrana no permite el paso de sustancias del medio de reacción, a excepción del oxígeno, ya que éstas podrían dañar el electrodo modificando sus propiedades electroquímicas. Se utilizó un agitador magnético para evitar la formación de gradientes de oxígeno y depósito de sustancias, que pudieran estar en la mezcla de reacción, y que pudieran interferir en las medidas. Los ensayos se realizaron con la suspensión mitocondrial obtenida en el aislamiento. Una vez conocida la concentración de proteína de la muestra por el método de Biuret, se añadió a la mezcla de reacción el volumen necesario para tener una concentración óptima para el

ensayo, 0,7 mg/ml de proteína mitocondrial para corazón y músculo y 4-5 mg/ml de proteína mitocondrial para hígado.

Se midió el consumo de oxígeno de cada muestra con varios sustratos. Con cada uno de ellos, se valoró primero el estado 4 (estado no fosforilante) y, posteriormente el estado 3 (estado fosforilante) mediante la adición de ADP (500 $\mu$ M) (Figura 21). Con estos dos datos se calculó el Índice de Control Respiratorio (RCR) como medida de acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa indicando si las mitocondrias están o no en buen estado funcional. Un RCI alto indica la presencia de mitocondrias en buen estado funcional y poco dañadas en el proceso de aislamiento (Barja, 1999).

**Figura 21:** Medición del consumo de oxígeno



Siempre que fue necesario cambiar la membrana de polietileno se procedió a calibrar el aparato. Para esto se dejó la cámara de medida abierta con 1ml de agua destilada. Cuando se estabilizó la medida se ajustó el cero de oxígeno mediante el desplazamiento de éste con nitrógeno. Cada día, antes de comenzar el ensayo, se

realizó una deriva (medida del índice de consumo de oxígeno por parte del electrodo en ausencia de mitocondrias) para restarla posteriormente a las medidas de consumo de oxígeno de las muestras.

Cada prueba se realizó con un volumen total de 0,5 ml de los cuales:

- “x” volumen de suspensión mitocondrial (en función de la concentración de proteína obtenida).

- 10 µl de sustrato. Los sustratos empleados se añadieron a partir de concentraciones iniciales de piruvato-malato (125 mM cada uno), glutamato-malato (125 mM cada uno) y succinato (250 mM).

- 10 µl de ADP 25 mM (inicial).

- 10 µl del inhibidor rotenona (100 µM inicial), cuando se empleó succinato como sustrato.

- Hasta 0,5 ml se completó con medio de incubación con albúmina, formado por KCl 145 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 5 mM, HEPES 30 mM, EGTA 0,1 mM y albúmina de suero bovino al 0,1%, a pH 7,4 y 37° C (Barja, 1999).

Para calcular el consumo de oxígeno,  $VO_2 = \text{nmoles } O_2 / \text{mg proteína} \cdot \text{minuto}$ , se utilizó la siguiente fórmula:

$$VO_2 = \frac{a - b}{c}$$

Donde:

a = pendiente de la prueba (nmoles  $O_2$  / ml · min)

b = pendiente de la deriva (nmoles  $O_2$  / ml · min)

Así se obtuvo el consumo de oxígeno

estos datos se pudo calcular el RCI (índice de Control Respiratorio), según la siguiente fórmula:

$$RCI = \frac{VO_2 \text{ en estado 3}}{VO_2 \text{ en estado 4}}$$

En el caso del **Estudio 3**, la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial se monitorizó con un electrodo tipo Clark (Yellow Springs Instrument) en una cámara sellada a 37 °C, según (Shabalina et al., 2004). Se añadieron las mitocondrias en a una concentración de 0.5 mg en 1.1 ml de medio de incubación en agitación. La respiración basal de la mitocondria se midió en presencia de glutamato 5mM+malato 3mM. Para estimar la fosforilación oxidativa, se añadió ADP 450  $\mu$ M seguido de oligomicina a una concentración de 3  $\mu$ g/ml para inhibir la fosforilación y obtener el ratio de control respiratorio. Finalmente, se añadió FCCP 0,8  $\mu$ M (carbonil cianido p-trifluorometoxifenilhidrazona), un desacoplante químico de la fosforilación oxidativa, para determinar la capacidad máxima de transporte de electrones a través de la cadena respiratoria.

#### **1.4. Producción mitocondrial de ROS**

La producción mitocondrial de ROS se estimó mediante una técnica fluorimétrica de determinación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Ruch et al., 1983) adaptada para trabajar con mitocondrias (Barja, 2002). Este método detecta la fluorescencia del dímero que se forma por la oxidación del ácido homovanílico con el  $H_2O_2$  en presencia de peroxidasa de rábano (HRPx).

Las medidas de fluorescencia (excitación: 312 nm, slit 5 nm; emisión 420 nm, slit 10nm) se realizaron a punto final y en un volumen total de 1,5 ml. Se empleó el mismo medio de incubación que se usó en las medidas de consumo de oxígeno mitocondrial (KCl 145 mM,  $Cl_2Mg$  3 mM,  $H_2KPO_4$  5 mM, HEPES 30 mM, EGTA 0,1 mM, albúmina de suero bovino al 0,1%, solución a pH 7,4 y 37 °C), en presencia de un volumen de proteína mitocondrial de 0,25 mg/ml, 38  $\mu$ l de HMV (4mM), 123  $\mu$ l de HRPx (70 U/ml), 12  $\mu$ l de SOD (que corresponden en el ensayo a 50 U/ml de SOD) y/o 30  $\mu$ l de inhibidor (rotenona 100  $\mu$ M, o antimicina A (AA) 500  $\mu$ M) cuando proceda. Finalmente se añadieron 30  $\mu$ l de sustrato: piruvato-malato o succinato (125mM cada uno en la solución inicial), según correspondiera.



El ensayo estima la producción mitocondrial de ROS ( $O_2^{\cdot -} + H_2O_2$ ), ya que la enzima SOD añadida en exceso convierte los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) producidos por las mitocondrias en  $H_2O_2$  (Barja, 2002)

Tras añadir los sustratos la mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Una vez transcurrido dicho tiempo, la reacción se detuvo introduciendo cada tubo en un baño de hielo y añadiéndole al mismo tiempo 0,5 ml de glicina 2 M con EDTA 50 mM y NaOH 2,2 M. Todos los ensayos se realizaron por duplicado con sus blancos correspondientes. Para los tubos con antimicina se hicieron sus propios blancos (con antimicina y sin sustrato) ya que la reacción no se para del todo.

Como estándar se usó el sistema glucosa-glucosa oxidasa (GO). Esta enzima genera  $H_2O_2$  de manera dependiente de la cantidad de glucosa oxidasa añadida, en un medio con glucosa en exceso. El estándar se ensayó en las mismas condiciones que las muestras, en el mismo volumen final (1,5 ml) y utilizando su propio blanco (150  $\mu$ l de medio en lugar de 150  $\mu$ l de glucosa). A cada tubo estándar se le añadieron: 1175  $\mu$ l de medio de incubación, 123  $\mu$ l de HRPx (70 U/ml), 38  $\mu$ l de HMV (4 mM), 10  $\mu$ l de GO (a la concentración necesaria para que la cantidad de GO en el tubo de reacción sea la adecuada para generar un nmol de  $H_2O_2$ /min) y 150  $\mu$ l de glucosa (140 mM).

Al final se estimó la producción mitocondrial de ROS a tiempo final realizando los siguientes cálculos:

$$ROS = \frac{UFM \times F}{P \times S} \times 2,75$$

ROS = Producción mitocondrial de ROS medida como nmol  $H_2O_2$  / min · mg proteína.

UFM =unidades de fluorescencia por minuto, se calcula como:

$$UFM = \frac{\text{Fluorescencia muestra} - \text{Fluorescencia blanco muestra}}{15 \text{ minutos}}$$

F = Factor de dilución: 2000  $\mu\text{l}$  / volumen mitocondrias ( $\mu\text{l}$ ).

P = mg proteína / ml en la suspensión mitocondrial.

S= fluorescencia del estándar de glucosa que corresponde a 1 nmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /minuto· ml.

2,75 = factor de corrección aplicado para adaptar las unidades de glucosa oxidasa de las condiciones descritas por el proveedor (pH 5,1 y 35 °C) a las condiciones en las que se realiza la incubación (pH 7,4 y 37 °C).

### **1.5. Fuga de radicales libres**

Las medidas de consumo de oxígeno y de producción de ROS mitocondrial se realizaron en las mismas muestras y bajo las mismas condiciones (medio de incubación, concentraciones de sustratos e inhibidores, temperatura, y pH). Esto permitió relacionar estas medidas para calcular el porcentaje de fuga de radicales libres (%FRL).

Este factor representa la fracción de electrones de la cadena respiratoria que reducen incompletamente el oxígeno a ROS en vez de formar agua en el Complejo IV. Como se necesitan 4 electrones para reducir el  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , y solamente 2 para reducirlo a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la FRL se calculó como la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dividida por dos veces el consumo de oxígeno multiplicado por 100, tal y como indica la siguiente ecuación:

$$\% \text{ FRL} = 100 \times \frac{\text{Producción de } \text{H}_2\text{O}_2}{2 \times \text{VO}_2}$$

Por ejemplo, un resultado del 4% indica que el 4% de los electrones que fluyen por la cadena de transporte de electrones se combinan con el oxígeno para producir ROS.

## **2. DAÑO OXIDATIVO AL ADN MITOCONDRIAL**

La cuantificación del daño oxidativo al ADN mitocondrial se realizó valorando los niveles del deoxinucleósido oxidado 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), en relación con su base no modificada deoxiguanosina (dG). Dicha valoración se realizó mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección culométrica en el caso de la 8-oxodG, y ultravioleta, en el de la dG.

### ***2.1. Aislamiento del ADN mitocondrial***

Para el aislamiento y precipitación del ADN mitocondrial se siguió el método de Latorre y colaboradores (Latorre et al., 1986) adaptado a mamíferos (Asuncion et al., 1996; Barja y Herrero, 2000).

Se utilizaron muestras de los diferentes tejidos congeladas a -80 °C desde el sacrificio de los animales. Tras descongelarlas, las diferentes muestras se homogeneizaron, a 4°C, a razón de 1,5 ml de tampón de homogeneización (TRIS 10 mM, NaCl 60 mM, sacarosa al 5% y EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,8) por gramo de tejido para hígado y 3 ml de tampón para corazón y músculo. Posteriormente se mezclaron:

- 300 µl de dicho homogenado.
- 300 µl de tampón TRIS 300 mM con SDS al 1,25%, sacarosa al 5% y EDTA- Na<sub>2</sub> 10 mM, pH 9.
- 400 µl de cloroformo: alcohol isoamilo (49:1, v/v) para separar los lípidos.

La mezcla se centrifugó 10 minutos a 500g. Se recogió la fase superior y se incubó durante 30 minutos a 65 °C. De este modo, conseguimos romper las membranas y liberar el contenido celular, a la vez que se desnaturalizan las proteínas con el SDS. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C.

Tras esto se añadieron 0,12 ml de acetato potásico 3M, pH 4,8 a las muestras y se incubaron 10 minutos a -20 °C, para provocar la precipitación del ADN de alto peso molecular (principalmente ADN nuclear), debido al descenso de pH junto con la alta concentración de sales. Además el potasio forma complejos con el SDS-proteína, facilitando su precipitación.

Después de su descongelación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000g a 4 °C y se recogió el sobrenadante conteniendo el ADNmt (en el sedimento quedaron restos celulares, complejos SDS-proteína y ADN nuclear).

El sobrenadante se mantuvo en hielo y se añadió idéntico volumen de isopropanol; pudiendo apreciar ya el ADNmt como turbidez en la suspensión tras mezclar por inversión.

A continuación se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000g 10 minutos a 4 °C. Tras decantar el sobrenadante, en el sedimento quedó el ADN mitocondrial parcialmente purificado. Se añadieron 0,5 ml de etanol al 70% frío para conservarlo a -20 °C.

Las muestras se volvieron a centrifugar a 10.000g durante 10 minutos a 4 °C. Se decantó el etanol y el remanente se evaporó con nitrógeno para secar el precipitado. Se añadieron entonces 150 µl (para corazón y músculo) y 300 µl (para hígado) de tampón TE (TRIS-HCl 10 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM, pH 8), para resuspender los pellets y se añadieron 10 µl de RNAsa (112,5 U disuelta en tampón TE).

Tras 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 0,3 ml de SDS 0,1%, pH 12,5. Se incubaron a 65 °C otros 6 minutos, se añadieron 230 µl de acetato sódico 3 M, (pH 4,8) y se volvieron a incubar a -20 °C durante 20 minutos.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron a 10000g 5 minutos y se mantuvieron en hielo. Se recogió el sobrenadante y se añadió igual volumen de isopropanol incubándose 5 minutos de nuevo a temperatura ambiente.

Seguidamente se centrifugó a 10000g durante 10 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se añadieron 0,5 ml de etanol al 70% frío (a -20 °C), volviéndose a centrifugar durante 5 minutos a 10.000g y 4 °C. Se decantó el etanol y las muestras se secaron con nitrógeno (evitando un secado excesivo para no oxidar artificialmente la dG y sobrevalorar los valores de 8-oxo dG). Finalmente, se resuspendió el sedimento en 35 µl (corazón y músculo) o 50 µl (hígado) de tampón TE, pH 8.

Las muestras se mantuvieron en frío (4 °C) durante aproximadamente 30 minutos (o toda la noche) para permitir su completa disolución.

Una vez comprobado que el ADN está bien disuelto en el tampón TE (pH 8) y medida su concentración por espectrofotometría (Genequant, Biochrom), se añadieron a las muestras 40 µl de acetato sódico 3 M (pH 4,8) y 800 µl de etanol al 70% frío (-20 °C); se centrifugaron a 10000g 10 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se decantó el sobrenadante, se añadió de nuevo 1 ml de etanol al 70% frío (-20 °C), y se volvió a centrifugar. Se eliminó el etanol de las muestras y se secaron con nitrógeno. El ADN se resuspendió en 100 µl de acetato sódico 20 mM (pH 4,8) y, por último, se incubaron las muestras a 50 °C durante 1 hora.

## **2.2. Digestión del ADN mitocondrial**

Tras la hora de incubación a 50 °C, se añadió a las muestras 20 µl de nucleasa P1 (5 U / muestra) disuelta en acetato sódico 20 mM, pH 4,8, que contenía cloruro de zinc 10 mM y 15% de glicerol, y se incubaron a 50 °C durante 30 minutos.

A continuación se añadieron 20 µl de fosfatasa alcalina (3 U / muestra), y se repitió la incubación a 50 °C durante 1 hora.

Por último se transfirieron las muestras a eppendorffs con filtro Whatman y se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos. De los filtrados se tomaron 100 µl para inyectar en HPLC.

## **2.3. Condiciones cromatográficas**

La determinación de los niveles de 8-oxodG y de dG se realizó por HPLC, a través de detección electroquímica y ultravioleta, respectivamente.

La cuantificación de dG por el detector ultravioleta se realizó a 254 nm con una sensibilidad de 0,64 mientras que para determinar los niveles de 8-oxodG el detector coulométrico se ajustó a unas condiciones de 275 mV/20 nA.

El volumen inyectado fue 100 µl en todos los casos, y la fase móvil utilizada (ácido fosfórico 50 mM, acetonitrilo al 2,5%, pH 5) se filtró a través de filtros de

diámetro de poro 0,45  $\mu\text{m}$ . El flujo de paso de fase móvil fue de 0,9 ml/min con una presión aproximada de 1.500 psi mediante una bomba Gilson 305 con un módulo nanométrico Gilson 805, en una columna mediterránea sea18 (5  $\mu\text{m}$  25x0,46) de Teknokroma que se mantuvo a 30 °C con un horno de columna Eppendorf CH-500.

#### 2.4. Cálculo de las concentraciones de dG y 8-oxo dG

Para cuantificar los valores obtenidos, se inyectaron cada día estándares de dG y de 8-oxodG de concentraciones conocidas. Así, en el caso de la dG, se inyectó una solución estándar pura de dG 100  $\mu\text{M}$  en acetato sódico 10 mM, pH 4,8 y TRIS 1 M, pH 8 (11:1). Para la 8-oxodG, la solución estándar inyectada fue 20 nM disuelta en el mismo solvente. Los estándares nos permiten identificar los picos correspondientes a la 8-oxodG y a la dG gracias a los tiempos de elución, y además nos permiten determinar la concentración de ambos compuestos en las muestras.

De este modo, la concentración de 8-oxodG de la muestra se calcula mediante la siguiente expresión:

$$[8oxodG] = \underset{\downarrow}{Area_{8oxodG}} \times \frac{10}{A_{8oxodG}} \longrightarrow \text{Área del pico de 8-oxodG del estándar.}$$

Área del pico de 8-oxodG de la muestra.

Asimismo, la concentración de dG de la muestra se calcula mediante la siguiente expresión:

$$[dG] = \underset{\downarrow}{Area_{dG}} \times \frac{100}{A_{dG}} \longrightarrow \text{Área del pico de dG del estándar.}$$

Área del pico de dG de la muestra.

Finalmente, se obtuvo la razón 8-oxodG /  $10^5$  dG como indicador del daño oxidativo al ADN:

$$\frac{8oxodG}{10^5 \times dG} = \frac{100 \times 8oxodG}{dG}$$

### 3. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

#### 3.1. Preparación de las muestras

Las muestras del tejido se homogeneizaron en tampón Hepes 10 mM, pH 1,4, al que se le añadió BHT 1  $\mu$ M, DETAPAC 1 mM y ácido fítico 1 mM, como antioxidantes. Además se añadieron inhibidores de la proteólisis, como leupeptina (0,5  $\mu$ g/ml), aprotinina (0,5  $\mu$ g/ml), pepstatina (0,7  $\mu$ g/ml), PMSF (40  $\mu$ g/ml) y EDTA (1,1 mM). A continuación se procedió a la extracción de lípidos de las muestras mediante cloroformo:metanol en una proporción 2:1 (v/v) según Folch y colaboradores (Folch, 1975). Una vez eliminada la fase clorofórmica, las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% (concentración en la mezcla de precipitación), acelerando la precipitación mediante una centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Tras centrifugar, se redujeron las muestras incubándolas toda la noche con 1 ml de NaBH<sub>4</sub> (500 mM) disuelto en un tampón de ácido bórico (0,2 M, pH 9,2), con una gota de hexanol como agente antiespumante. Las proteínas se precipitaron de nuevo añadiendo 1 ml de ácido tricloroacético al 10% para, seguidamente, centrifugarlas otra vez a 3.000 rpm durante 15 minutos. Este último paso se repitió dos veces.

#### 3.2. Síntesis de los estándares internos

Para la síntesis de los diferentes estándares internos (deuterados y no deuterados) se procedió del siguiente modo: la N<sup>ε</sup>-(carboxietil)-lisina (CML) y la [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-CML se sintetizaron a partir de la reacción del ácido glioxídico con N<sup>ε</sup>-acetil[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-lisina

respectivamente, en presencia de cianoborohidruro sódico. La CML se aisló por cromatografía de intercambio iónico, comprobándose su estructura y homogeneidad por GC/MS y por análisis de aminoácidos (Knecht et al., 1991). La N<sup>ε</sup>-(carboximetil)-lisina (CEL) y la [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-CEL se sintetizaron mediante la reacción de piruvato con formil-lisina y [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-lisina, respectivamente, en presencia de cianoborohidruro sódico (relación molar 1:1:3) en tampón fosfato 0,2 M a pH 7,4 y 37 °C durante 3 días (Ahmed et al., 1997).

Para la síntesis de N<sup>ε</sup>-(malondialdehído)-lisina (MDAL) y [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-MDAL fue necesario obtener previamente malondialdehído (MDA). Este se preparó justo antes de su uso por hidrólisis de su forma dimetilacetal añadiéndole 1ml HCl (1M) durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se cuantificó midiendo la absorbancia a 245 nm, y utilizando su coeficiente de extinción molar (137.000 M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>). Para obtener MDAL o [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-MDAL, se incubó lisina o [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-lisina con una cantidad equimolecular de MDA en presencia de cianoborohidruro sódico en exceso (8 veces la cantidad de lisina o [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-lisina) en tampón fosfato (0,2 M, pH 7,4 y 37 °C) durante toda la noche (Requena et al., 1997).

Para obtener los carbonilos proteicos específicos semiadehído glutámico (GSA) y semialdehído aminoalípico (AASA) se utilizó el método descrito por Requena y colaboradores (Requena et al., 1997). El ácido 5-hidroxi-2-aminovalérico (HAVA), producto de la reducción del GSA, se obtuvo de la purificación del éster del ácido 5-metilglutámico en una columna de intercambio iónico Dowex-50W seguido de precipitación con metanol. Para preparar d5-HAVA se utilizaron 100 mg de ácido d5-2,3,3,4,4-L-glutámico, que se convirtió en el correspondiente éster metílico mediante el tratamiento con ácido metanólico-HCl. Tras la evaporación, el producto se trató como se describe para la preparación del HAVA. El ácido 6-hidroxi-2-aminocaproico (HACA), producto de la reducción del AASA, se precipitó con metanol. El d4-AASA se preparó partiendo de 250 mg de D-L-lisina-4,4,5,5-d4-2HCl que se convirtieron a N-α-formil-d4-lisina. El producto se evaporó y se disolvió en 20 ml de agua. Tras ajustar el pH a 9,5 con NH<sub>4</sub>OH se añadieron 320 mg de nitroprusiato sódico durante 20 minutos, mientras se alcanzaban los 60° C y se ajustaba el pH cuando era necesario. La solución resultante se calentó durante 4 horas más, ajustando nuevamente el pH. El producto



de la reacción se filtró e hidrolizó con HCl (6 M) durante 1 hora a 100 °C. Después de la evaporación, el producto se disolvió en ácido fórmico (pH 2) y se filtró en una columna de intercambio iónico Dowex-50W. El producto final se precipitó con un pequeño volumen de metanol caliente. Las preparaciones de HAVA, d5-HAVA, ASSA y d4-GSA se disolvieron en agua desionizada y se calibraron con una mezcla de aminoácidos.

Las muestras y los estándares se analizaron por HPLC en un sistema Hewlett-Packard Serie 110, después de su derivación automática con orto-ftalaldehído (OPA). El área media de Ser, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Met y Val se utilizó para calcular la concentración de HAVA, d5-HAVA, HACA o d4-HACA en cada preparación. Los análisis se realizaron por triplicado para cada solución, y se congelaron alícuotas a -70 °C para su posterior utilización (Requena et al., 1997).

### **3.3. Análisis de AASA, CEL, CML, MDAL y GSA**

Las concentraciones de GSA, AASA, CML y CEL se determinaron por cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC/MS) según (Pamplona et al., 1999a; Pamplona et al., 2000). A las muestras reducidas se les añadieron los estándares internos deuterados marcados isotópicamente: d8-lisina (120 nmoles), d4-CML (474 pmoles), d4-CEL (432 pmoles), d8-MDAL (216 pmoles), d5-GSA (648 pmoles) y d4-AASA (140 pmoles). Las muestras se sometieron a hidrólisis añadiendo 1ml de HCl (6N) e incubando a 155 °C durante 30 minutos. Los hidrolizados obtenidos se rehidrataron en 1ml de ácido trifluoroacético al 1% y se aplicaron a columnas de extracción en fase sólida C-18 de 1ml (Supelco), equilibradas previamente con el mismo solvente. Se recogió el primer ml eluído y los 2 ml adicionales de ácido trifluoroacético al 1%, para, posteriormente, secarse al vacío.

Los derivados N,O-trifluoroacetil de los ésteres metílicos del hidrolizado de proteínas se obtuvieron incubando la muestra en 1 ml de metanol:HCl al 5% durante 30 minutos a 65 °C seguida de evaporación bajo flujo de nitrógeno para obtener los ésteres metílicos. Los ésteres metílicos del hidrolizado se incubaron con 1 ml de ácido trifluoroacético anhidro durante 60 minutos a temperatura ambiente para obtener los derivados trifluoroacetil. A continuación el agente derivatizador se evaporó bajo flujo

de nitrógeno para finalmente redissolver las muestras en 100 µl de cloruro de metileno y centrifugar a 800g durante 5 minutos para eliminar los posibles precipitados. Los sobrenadantes se traspasaron a viales y se inyectaron alícuotas de 2 µl en el sistema de GC/MS para su análisis y cuantificación.

### **3.4. Cromatografía de gases/ espectrometría de masas**

Los análisis GC/MS se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 6890 equipado con una columna capilar de 30 m HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5973a en modo de impacto iónico. El puerto de inyección se mantuvo a 275 °C y el programa de temperaturas fue el siguiente: 5 minutos a 110°C, luego 2 °C/minuto hasta 150 °C, 5 °C/minuto hasta 240 °C, 25 °C/minuto hasta 300 °C y al final se mantuvo la temperatura a 300 °C durante 5 minutos. Para la cuantificación se utilizaron curvas patrón construidas a partir de la mezcla de estándares deuterados y no deuterados.

Los análisis se realizaron mediante monitorización de iones específicos seleccionados previamente (SIM). Los analitos se detectaron por SIM - GC/MS. Los iones usados fueron lisina (con una m/z de 180) y d8-lisina (con una m/z de 187); GSA (con una m/z de 280) y d5-GSA (con una m/z de 285); AASA (con una m/z de 294) y d4-AASA (con una m/z de 298); CML (con una m/z de 392) y d4-CML (con una m/z de 396); CEL (con una m/z de 379) y d4-CEL (con una m/z de 383); y MDAL (con una m/z de 474) y d8-MDAL (con una m/z de 482). Las concentraciones finales se expresaron en µmoles de GSA, AASA, CML, CEL o MDAL / mol lisina.

## **4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS TOTALES**

### **4.1. Extracción de lípidos**

Las muestras se prepararon como se indica en el apartado 3.1. de esta sección. La extracción de lípidos de las muestras se realizó utilizando cloroformo:metanol en una proporción 2:1 (v/v) en presencia de butilhidroxitolueno (BHT) al 0,01%, según (Folch, 1975). Seguidamente se separó la fase orgánica y se evaporó bajo un flujo de

nitrógeno en un evaporador N-evap Model 111. La fase lipídica se sometió a un proceso de transesterificación mediante incubación con 2,5 ml de metanol-HCl al 5% durante 90 minutos a 75 °C. La solución metanol-HCl se preparó añadiendo 1,3 ml de cloruro de acetilo a 18,7 ml de metanol, para producir HCl anhidro. De este modo se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Se procedió a la extracción de estos ésteres metílicos añadiendo 2,5 ml de n-pentano y 1 ml de solución saturada de NaCl, agitando durante 60 minutos en un vibrador de brazo oscilante Vibromatic-384 y centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fase de n-pentano se separó y se evaporó bajo flujo de nitrógeno. Por último, los ésteres metílicos se disolvieron en 75 µl de disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>) como vehículo para su posterior análisis mediante cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC/MS).

#### **4.2. Condiciones cromatográficas**

Una vez obtenidos los correspondientes ésteres metílicos de los diferentes ácidos grasos, su separación se llevó a cabo en una columna SP2330 (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm) con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 Serie II. Como detector se utilizó un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5973A en modo de impacto iónico. El puerto de inyección se mantuvo a 220 °C y el detector a 250 °C; el programa de temperatura consistió en 100°C durante 2 minutos, subida de temperatura a 10°C/minuto hasta los 200 °C, 5 °C/minuto hasta los 240 °C y, por último, se mantuvo 10 minutos a 240 °C. La identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó por comparación con los correspondientes estándares. Los resultados se expresan como % respecto al total de lípidos.

#### **4.3. Cálculo de los índices relacionados con la composición lipídica**

Los diferentes índices se calcularon de la forma que se detalla a continuación:

- El contenido de ácidos grasos saturados (**SFA**, del inglés: **Saturated Fatty Acids**):
- **SFA** = [Σ%mol (8:0 + 10:0 + 11:0 + 12:0 + 13:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0 + 24:0)]

- El contenido de ácidos grasos insaturados (**UFA**, del inglés: *Unsaturated Fatty Acids*):
- **UFA** =  $[\sum\% \text{mol} (16:1 + 18:1 + 18:2 + 18:3 + 18:4 + 20:1 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 20:5 + 22:4 + 22:5 + 22:6)]$
- El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (**MUFA**, del inglés: *Monounsaturated Fatty Acids*):
- **MUFA** =  $[\sum\% \text{mol} (16:1 + 18:1 + 20:1 + 24:1)]$
- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados (**PUFA**, del inglés: *Polyunsaturated Fatty Acids*):
- **PUFA** =  $[\sum\% \text{mol} (18:2 + 18:3 + 18:4 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 20:5 + 22:4 + 22:5 + 22:6)]$
- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 (**PUFA(n-3)**):
- **PUFA(n-3)** =  $[\sum\% \text{mol} (18:3 + 20:5 + 22:5 + 22:6 + 24:5 + 24:6)]$
- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 6 (**PUFA(n-6)**):
- **PUFA(n-6)** =  $[\sum\% \text{mol} (18:2 + 16:4 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 22:4 + 22:5)]$
- La longitud media de la cadena (**ACL**, del inglés: *Average Chain Length*):
- **ACL** =  $[(\sum\% \text{totalC}_8 \times 8) + (\sum\% \text{totalC}_{10} \times 10) + (\sum\% \text{totalC}_{11} \times 11) + (\sum\% \text{totalC}_{12} \times 12) + (\sum\% \text{totalC}_{13} \times 13) + (\sum\% \text{totalC}_{14} \times 14) + (\sum\% \text{totalC}_{15} \times 15) + (\sum\% \text{totalC}_{16} \times 16) + (\sum\% \text{totalC}_{17} \times 17) + (\sum\% \text{totalC}_{18} \times 18) + (\sum\% \text{totalC}_{20} \times 20) + (\sum\% \text{totalC}_{22} \times 22) + (\sum\% \text{totalC}_{24} \times 24)] / 100$
- El índice de dobles enlaces (**DBI**, del inglés: *Double Bound Index*):
- **DBI** =  $[(1 \times \sum\% \text{ácidos monoenoicos}) + (2 \times \sum\% \text{ácidos dienoicos}) + (3 \times \sum\% \text{ácidos trienoicos}) + (4 \times \sum\% \text{ácidos tetraenoicos}) + (5 \times \sum\% \text{ácidos pentaenoicos}) + (6 \times \sum\% \text{ácidos hexaenoicos})]$
- El índice de peroxidizabilidad lipídica (**PI**, del inglés: *Peroxidizability Index*; Witting & Horwit, 1964):

- **PI** = [(0,025 x Σ% ácidos monoenoicos) + (1 x Σ% ácidos dienoicos) + (2 x Σ% ácidos trienoicos) + (4 x Σ% ácidos tetraenoicos) + (6 x Σ% ácidos pentaenoicos) + (8 x Σ% ácidos hexaenoicos)]

#### **4.4. Estimación de actividades desaturasa y elongasa**

Las actividades elongasa y desaturasa fueron estimadas a partir de ratios producto/sustrato específicos según Guillou y colaboradores (Guillou et al., 2010).

##### **DESATURASAS:**

Δ9 (n-7)	C16:1/C16:0
Δ9 (n-9)	C18:1/C18:0
Δ8 (n-6)	C20:3/C20:2
Δ5 (n-6)	C20:4/C20:3
Δ6 (n-3)	C24:6/C24:5
n-6#	C22:5/C18:2
n-3#	C22:6/C18:3

##### **ELONGASAS:**

ELOVL 3 (n-9)	C20:1/C18:1
ELOVL 6	C18:0/C16:0
ELOVL 1/3	C20:0/C18:0
ELOVL 1/3	C22:0/C20:0
ELOVL 1/3	C24:0/C22:0
ELOVL 5 (n-6)	C20:2/C18:2
ELOVL 2/5 (n-6)	C22:4/C20:4
ELOVL 2/5 (n-3)	C22:5/C20:5
ELOVL2 (n-3)	C24:5/C22:5
Beta-oxidación peroxisómica	C22:6/C24:6

Las diferentes letras indican diferentes actividades desaturasa o elongasa en diferentes sustratos.

## **5. CANTIDAD DE LOS COMPLEJOS I, II, III Y IV DE LA CADENA RESPIRATORIA ASÍ COMO DE LAS PROTEÍNAS mitoNEET, AIF, SIRT3 Y 5, MnSOD, ERK/p-ERK y MAPK/P-MAPK: ANÁLISIS DE WESTERN BLOT**

La cantidad de complejos de la cadena respiratoria (del I al IV), el factor de regulación del complejo I (AIF), del inglés *Apoptosis-inducing Factor*, los factores de biogénesis mitocondrial SIRT3 Y SIRT5 y las proteínas de la ruta de señalización ERK1/2 (ERK1/2 y p-ERK1/2; MAPK y p-MAPK), se estimaron mediante análisis de Western Blot (Sanz et al., 2006a; Sanchez-Roman et al., 2011).

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) y para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos monoclonales primarios específicos para las subunidades NDUFS3 (30 KDa) y NDUFA9 (39 KDa) del complejo I (1:1000 en ambos casos; ref. A21344 y A21343, respectivamente; Molecular Probes), la subunidad de 70000 Dalton, flavoproteína, del complejo II (1:500; ref. A11142, Molecular Probes), el CORE 2 (50 KDa) y la proteína Rieske (30 KDa) del complejo III (1:1000 en ambos casos; ref. A11143 y A21346, respectivamente; Molecular Probes), y la subunidad I, COXI, (40 KDa) del complejo IV (1:1000; ref. A6403; Molecular Probes), anticuerpos monoclonales específicos para el segmento C-terminal (comprendido del aminoácido 593 al 613) de AIF (1:1000; ref. A7549, Sigma) y para phospho-ERK1/2 y ERK 1/2 (1:500 ambos; ref. 4370 y 4695, Cell Signaling Technology).

Como control se utilizaron un anticuerpo anti-porina (1:15000; ref. A-31855, Molecular probes) o anti-tubulina (1:15000; ref. ab-77291, Abcam) para referir la cantidad total de las subunidades analizadas de los complejos I, II, III y IV o de las otras moléculas estudiadas frente a la masa mitocondrial total, representada por la cantidad de porina, o al contenido proteico total, representado por la cantidad de  $\beta$ -actina.

Se utilizó un anticuerpo secundario apropiado y un sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa para la detección del anticuerpo primario. La cuantificación y la grabación de la señal se realizaron con un equipo ChemiDoc de BioRad. Los datos se expresaron en unidades arbitrarias.

En el Estudio 2, los anticuerpos utilizados para estimar la cantidad de complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y mitoNEET fueron los siguientes: una mezcla de

anticuerpos monoclonales contra algunos componentes estructurales de la fosforilación oxidativa (Oxphos), tales como la subunidad NDUFB8 del complejo I, la subunidad SDHB del complejo II y la subunidad UQCRC2 del complejo III (1:10000); anticuerpo que reconoce la subunidad Cox4 del complejo IV (1:2000); anticuerpo que reconoce la subunidad Alfa del complejo V (1:2000) y anticuerpo anti-proteína mitoNEET (1:5000). En esta ocasión, las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry, y como proteína de referencia se utilizó una mezcla estándar de todas las muestras. La inmunodetección se visualizó mediante un anticuerpo secundario apropiado para cada primario, conjugado con un sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa (ECL kit, GE healthcare Life Sciences).

## **6. MEDIDAS DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS “in vivo”**

### **6.1. Temperatura rectal**

Para medir este parámetro se utilizó una sonda rectal (Thermocouple thermometer, modelo 8112-20, Cole-Parmer Instrument Company), diseñada para ratones. Se realizaron tres medidas a cada ratón, espaciadas entre sí dos semanas, siempre a la misma hora del día (11 a.m.).

### **6.2. Tasa metabólica**

Para estimar la tasa metabólica basal, cada ratón por separado se introdujo en un respirómetro cerrado (volumen total 5.700 ml), capturando el dióxido de carbono producido mediante una solución de KOH al 10%. Los niveles de CO<sub>2</sub> fueron siempre controlados con un detector multigás Dräger, y para cada serie de medidas se renovó la solución de KOH. La tasa de consumo de oxígeno de cada animal se midió con una sonda medidora de oxígeno (modelo 600 can 1691, Engineered Systems and Designs) a 23±1°C. El espacio dentro de la cámara era suficiente para no estresar a los animales pero eliminaba la posibilidad de que hicieran ejercicio, representando así la tasa metabólica de rutina del animal. Las medidas se realizaron al final del tratamiento con atenolol, durante 30 minutos (dentro de un rango en el que el consumo no es dependiente de la presión parcial de oxígeno, pO<sub>2</sub>).

El consumo de oxígeno de cada animal se calcularó mediante la siguiente fórmula:

$$VO_2 = [(O_2)_i - (O_2)_f] \times V_A \times 273 \times (P_i - P_{VH_2O}) / 100 \times T_i \times 760 \times g \times h$$

- $(O_2)_i$  y  $(O_2)_f$  = concentración inicial y final de  $O_2$  (%)
- $V_A$  = volumen de aire (ml) =  $V_{EFFECTIVO} - V_{ANIMAL}$
- $V_{EFFECTIVO}$  = volumen efectivo del respirómetro =  
 $V_{RESPIRÓMETRO} - V_{SONDA} - V_{AIREADOR} - V_{KOH\ 10\%} = 18842\ ml$
- $V_{ANIMAL}$  = volumen rata (ml) (Peso del animal considerando densidad=1)
- $P_{VH_2O}$  = presión de vapor de agua

### 6.3. Presión sanguínea y Frecuencia cardíaca

La frecuencia cardíaca y la presión sanguínea se midieron en ratones conscientes (no anestesiados), con un sistema manométrico no invasivo que se colocó en la cola de los animales (LE5001 Panlab Harvard Apparatus). Cada animal fue aclimatado mediante al menos tres medidas de prueba en tres semanas consecutivas antes de tomar las medidas definitivas. En cada sesión se tomaron al menos 8 lecturas consecutivas de los parámetros de cada animal y se calculó la media de ellas para obtener presión sistólica, diastólica y media. Estas medidas se tomaron a la misma hora del día y durante al menos dos meses de experimentación cada 1-2 semanas.

## 7. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

Los experimentos se llevaron siempre a cabo de 08:30 a 13:00 h. Los ratones se encontraban en ciclo de luz-oscuridad 12:12. Todos los procedimientos de llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española de “Protección de Animales Utilizados para Experimentación y otros fines científicos” y las Directivas de la Comunidad Europea (1201/2005).



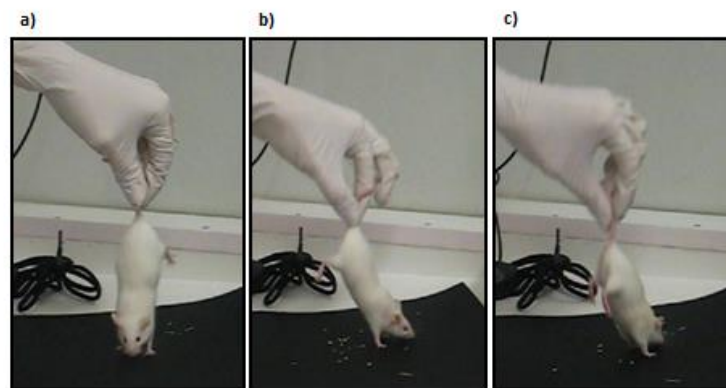
Las pruebas de comportamiento tuvieron lugar en cuatro días consecutivos. El primer día, los animales fueron sujetos a toda la batería de pruebas sensomotoras. En los siguientes días se realizaron las pruebas de campo abierto, tablero con agujeros y finalmente el laberinto en T. La secuencia de pruebas se basó en trabajos previos (Gimenez-Llort et al., 2002). El comportamiento fue evaluado por tres observadores independientes. Los senderos olfatorios se eliminaron limpiando las superficies de los aparatos después de cada prueba.

### ***Pruebas sensomotoras***

#### **7.1. Reflejo extensor del cuarto trasero**

Este reflejo se evaluó como la habilidad de llevar a cabo la extensión completa de los músculos del cuarto trasero cuando el animal se encuentra suspendido por la cola sobre una superficie negra. La respuesta media fue calificada en tres ensayos, y se calculó cómo el porcentaje de ratones que mostraron esta respuesta.

**Figura 22:** Reflejo extensor del cuarto trasero. a) y b) Se muestra reflejo. c) No se observa reflejo.



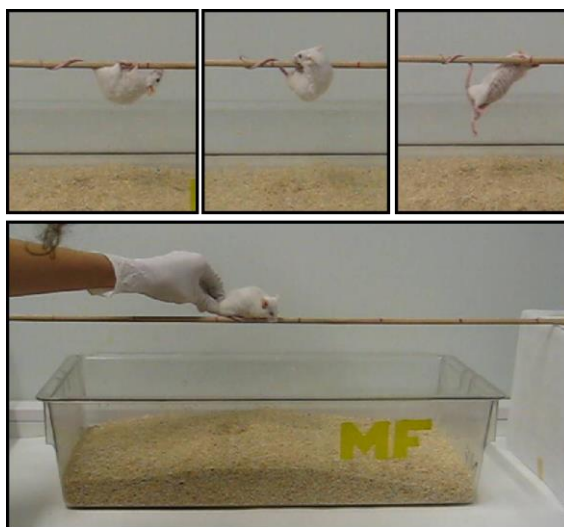
## **7.2. Prueba de la barra cilíndrica de madera**

Esta prueba se realizó con objeto de estudiar el equilibrio y la coordinación motora de los animales. Los ensayos se hicieron por duplicado y el tiempo máximo de duración de la prueba fue de 20 segundos.

La barra (medidas: 0,7 cm diámetro, 80 cm longitud, 22 cm altura) se encuentra elevada sobre un lecho de viruta en posición horizontal, dividida en segmentos de 10 cm de longitud. Se coloca al animal en la mitad de la barra y se suelta una vez que nos aseguramos de que está estable.

Se estudió la capacidad de los animales de permanecer en la barra como medida de equilibrio, analizando el porcentaje de animales de cada uno de los grupos que se cayeron del aparato durante el tiempo de realización de la prueba (y fueron, por tanto, incapaces de completarla) con respecto al total de animales de ese mismo grupo. La coordinación motora se estudió de acuerdo con dos criterios previamente definidos: 1) Porcentaje de animales que recorren al menos 1 segmento, y 2) Porcentaje de animales que completan la prueba (dentro de los 20 segundos establecidos como tiempo máximo de duración de la prueba).

**Figura 23:** Prueba de la barra cilíndrica de madera.

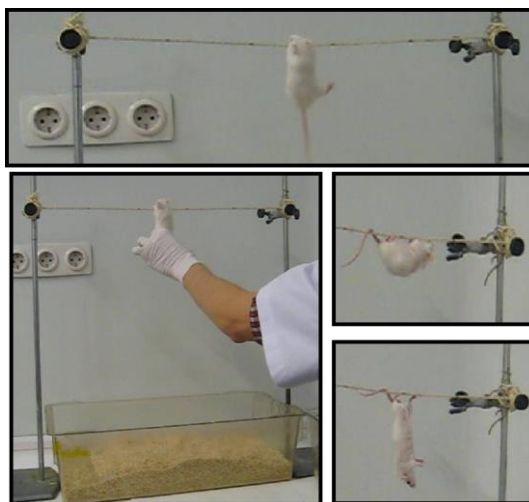


### 7.3. Prueba de la cuerda tirante

Esta prueba sirve para valorar el vigor muscular, la coordinación motora y la tracción de los animales (entendida esta última como las partes del cuerpo que son capaces de emplear para sostenerse en la cuerda: patas delanteras, traseras y cola). El aparato consiste en una cuerda de cáñamo de 60 cm de longitud y dividida en segmentos de 10 cm que se sitúa elevada (a una altura de 40 cm) en posición horizontal sobre un lecho de viruta. Los animales se colocaron en el centro de la cuerda tirante, suspendidos solamente con ayuda de las patas delanteras. Todos los animales realizaron dos ensayos de 5 segundos y finalmente se realizó la prueba, cuya duración fue de 60 segundos.

Como parámetros de vigor muscular se estudiaron: el porcentaje de animales que se cae de la cuerda y la latencia de caída (el tiempo que tarda en caerse, en segundos). En cuanto a la coordinación motora, se siguieron los criterios establecidos en las pruebas anteriores: 1) Porcentaje de animales que recorren al menos 1 segmento de la cuerda, y 2) Porcentaje de animales que completan la prueba (es decir, que alcanzan uno de los soportes situados en ambos extremos de la cuerda dentro del tiempo establecido). Finalmente, para el estudio de la tracción se recogió el porcentaje de animales de cada grupo que empleaban tres partes de su cuerpo como herramienta para permanecer colgados (patas delanteras, traseras y cola), dos de ellos (patas delanteras y cola, o patas delanteras y traseras) o uno solo (patas delanteras).

**Figura 24:** Prueba de la cuerda tirante.

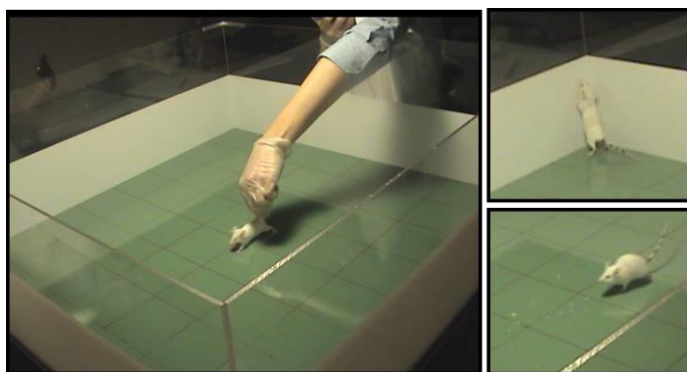


***Pruebas para medir la actividad exploratoria y los niveles de ansiedad******7.4. Prueba del campo abierto***

Esta prueba consiste en un tablero con paredes (dimensiones: 80 cm de ancho, 80 cm de largo y 30 cm de altura) dividido en 16 cuadrantes de 10 x 10 cm. Los 12 cuadrantes que componen el perímetro del tablero se consideran “cuadrantes externos”, y los restantes “cuadrantes internos”. La duración de la prueba son 5 minutos y comienza cuando se coloca al animal en el centro del tablero, de espaldas al investigador.

Como actividad locomotora horizontal se estudiaron: el tiempo en abandonar el punto central, el tiempo de entrada en periferia y las deambulaciones (total, externa e interna). En la actividad locomotora vertical se incluyen el porcentaje de animales que presentan conducta de “rearing” (postura erguida a la que se asocia un componente de exploración), así como el número total de éstos y el tiempo en que fueron llevados a cabo. El comportamiento de “grooming” (conducta de acicalamiento o auto-aseo) comprende la latencia de aparición de la primera conducta de “grooming”, así como el número total de éstos. Finalmente, se estudió la presencia (%) de orina y de bolas fecales.

**Figura 25:** Prueba del campo abierto.

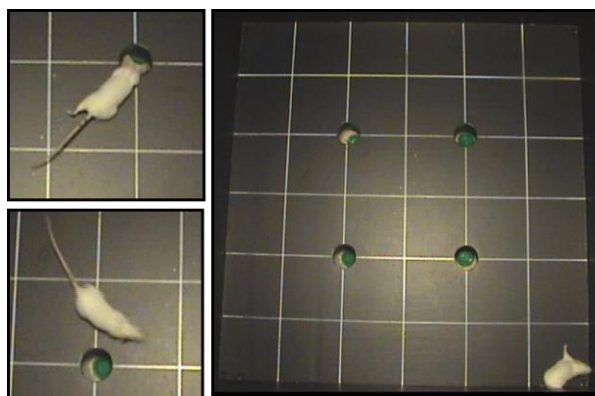


### 7.5. Prueba del tablero de agujeros

Esta prueba se llevó a cabo en un tablero de agujeros diseñado específicamente para ratón (dimensiones: 60 cm de ancho, 60 cm de largo y 45 cm de alto), con una pared oscura de metacrilato y una base con cuatro agujeros de idéntico tamaño (3,8 cm de diámetro). En cada uno de los agujeros se introdujo un objeto de plástico para atraer la atención del animal. La base del tablero está dividida en 36 cuadrantes de 10 x 10 cm. De ellos, los 20 que componen el perímetro se consideran “cuadrantes externos”, y el resto son los “cuadrantes internos”. La prueba se realiza durante 5 minutos, y comienza cuando el animal es colocado en una de las esquinas del tablero, de espaldas al investigador.

Se valoraron parámetros de comportamiento exploratorio “no dirigido” como las deambulaciones interna y externa (actividad exploratoria horizontal), mientras que el número de veces que el animal introduce la cabeza en los agujeros (término conocido como “Head-dipping”) se estudia como medida del comportamiento exploratorio “dirigido”. Además se analizó la presencia (%) de orina y bolas fecales.

**Figura 26:** Prueba del tablero con agujeros.

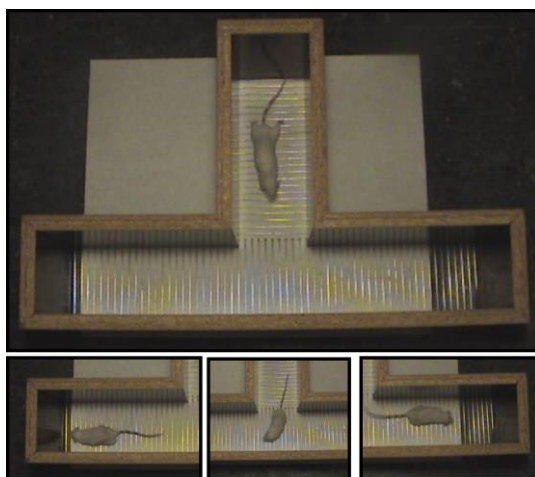


### **7.6. Prueba del laberinto en T**

El laberinto el T consta de tres brazos con paredes cuyas caras internas están recubiertas con chapa plástica negra. Los brazos miden 10cm de ancho, 25 cm de largo y 20 cm de alto. El suelo del laberinto consta de varillas cilíndricas de aluminio de 3 mm de grosor colocadas a 5 mm una de la otra y situadas transversalmente a las paredes laterales de cada brazo.

El desarrollo de la prueba consiste en colocar al ratón mirando a la pared del brazo de salida de la T, en la zona distal de la convergencia. Se registra el tiempo (en segundos) que tarda el animal en salir completamente (con las cuatro patas) del brazo inicial.

**Figura 26:** Prueba del laberinto en T.



## **8. ESTUDIOS DE FUNCIÓN INMUNITARIA**

### **8.1. Obtención de suspensiones de leucocitos de bazo**

Los bazos se extrajeron en condiciones asépticas y libres de grasa. Seguidamente se trocearon con unas tijeras y se prensaron suavemente a través de un tamiz de malla. Las suspensiones se centrifugaron en un gradiente de histopaque de densidad con una densidad de 1,070 g/ml. Las células de la interfase se resuspendieron en medio RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina y suplementado con suero fecal bovino

al 10% inactivado por calor y gentamicina al 1% (10mg/ml). Tras un lavado, se determinó el número de leucocitos. La viabilidad celular se midió rutinariamente antes y después de cada experimento por la prueba de exclusión del tripán azul, siendo superior al 95% en todos los casos. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C y en una atmósfera humidificada al 5% con CO<sub>2</sub>.

### **8.2. Capacidad de movilidad inducida o quimiotáxis de los leucocitos**

El ensayo se llevó a cabo siguiendo una modificación del método de Boyden (Boyden, 1962) descrito por Guayerbas y colaboradores (Guayerbas et al., 2002b). Se utilizaron cámaras con dos compartimentos separados por un filtro de 3 µm de diámetro de poro. Se colocaron alícuotas de 300 µl de la suspensión de leucocitos en el compartimento superior, y alícuotas de 400 µl del quimioatrayente fMet-Leu-Phe a una concentración de 10<sup>-8</sup> M en el compartimento inferior. Después de incubar las cámaras durante tres horas, los filtros se fijaron, se tiñeron y se calcularon los índices de quimiotáxis (CI). Estos índices se obtuvieron contando el número total de leucocitos en un tercio de la cara inferior de los filtros en un microscopio óptico, y se realizó por duplicado en cada muestra.

### **8.3. Capacidad proliferativa de los linfocitos**

Esta prueba se llevó a cabo siguiendo el método descrito previamente (Del Rio y De la Fuente, 1994) (1994). Se cultivaron alícuotas de 200 µl de suspensiones de leucocitos de bazo en placas de 96 pocillos de fondo plano con 20 µl de medio completo (basal), Con A (concanavalina A) o LPS (1µg/ml). Las placas se incubaron durante 48 horas haciendo triplicados de cada muestra. Tras la incubación, se añadió 0,5 µCi 3Htimidina a cada pocillo. Después de 24 horas se sembraron las células y se midió la incorporación de timidina en un contador beta durante un minuto. Los resultados se expresaron como cuentas por minuto (cpm) además de cómo porcentaje de proliferación (índice de estimulación) en respuesta a Con A y LPS, referido al 100% de captación de timidina en cpm en los pocillos control (sin mitógeno).

### **8.4. Estudio de la actividad citotóxica Natural Killer (NK)**

Se utilizó un ensayo enzimático colorimétrico para medir la citólisis de células diana, basado en la determinación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), usando sales de tetrazolio como se ha descrito previamente (Ferrandez y De la Fuente, 1999). Las células diana (células de linfoma murino YAC-1) se cultivaron en placas de 96 pocillos a una concentración de  $10^4$  células/pocillo en medio RPMI 1640 sin rojo fenol. Se añadieron células efectoras (leucocitos de bazo) a una concentración de  $10^5$  células/pocillo, obteniendo así una relación 10/1 de efector/diana. Cada muestra se ensayó por triplicado. Las placas se centrifugaron 4 minutos a 250 g para facilitar el contacto célula a célula y se incubaron durante 4 horas. Después de la incubación, las placas se centrifugaron de nuevo 4 minutos a 250 g y se midió la actividad LDH añadiendo 50  $\mu$ l del sustrato de la enzima en cada pocillo midiendo la absorbancia a 490 nm. Se realizaron tres tipos de medidas control: la liberación espontánea de la diana, la liberación máxima de la diana, y la liberación espontánea del efector. Para determinar el porcentaje de lisis de la células diana se utilizó la siguiente ecuación: %Lisis =  $((E-ES-TS)/(M-ES-TS)) \times 100$ , donde E es la media de las absorbancias en presencia del efector y de las células diana; ES la media de las absorbancias de las células efectoras incubadas solas; TS la media de las absorbancias en células diana incubadas con medio; y M es la media de las máximas absorbancias después de incubar células diana con solución de lisis.

## 9. METODOS ESTADÍSTICOS

### 9.1. Características muestrales

De cada conjunto de datos se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Media aritmética de cada grupo de datos:  $\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X}{n}$

- Desviación típica de la media:  $\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$

- Error estándar de la media:  $SEM = \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$



## **9.2. Análisis estadísticos**

El Test estadístico empleado para valorar las diferencias entre las medias de los cuatro grupos experimentales en el estudio 2, fue el análisis de la varianza factorial (ANOVA) de dos vías.

Tras el ANOVA y cuando fue necesario se realizó, a posteriori, como segundo Test, la prueba LSD o t-student por pares a fin de precisar entre qué grupos concretos existían diferencias.

Para analizar el resto de los experimentos se utilizó, como prueba estadística, el Test t de Student.

Las curvas de supervivencia se realizaron mediante la función Kaplan-Meier y se analizaron mediante los test Log Rank y Wilcoxon.

El nivel mínimo de significación fue 0,05 en todas las comparaciones. El grado de significación obtenido se representó en todas las tablas y gráficas como: \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

Los parámetros, las pruebas estadísticas y la comprobación de que las condiciones de aplicación de dichas pruebas se cumplían se realizaron con el programa Statgraphics Plus 5.0.



## RESULTADOS



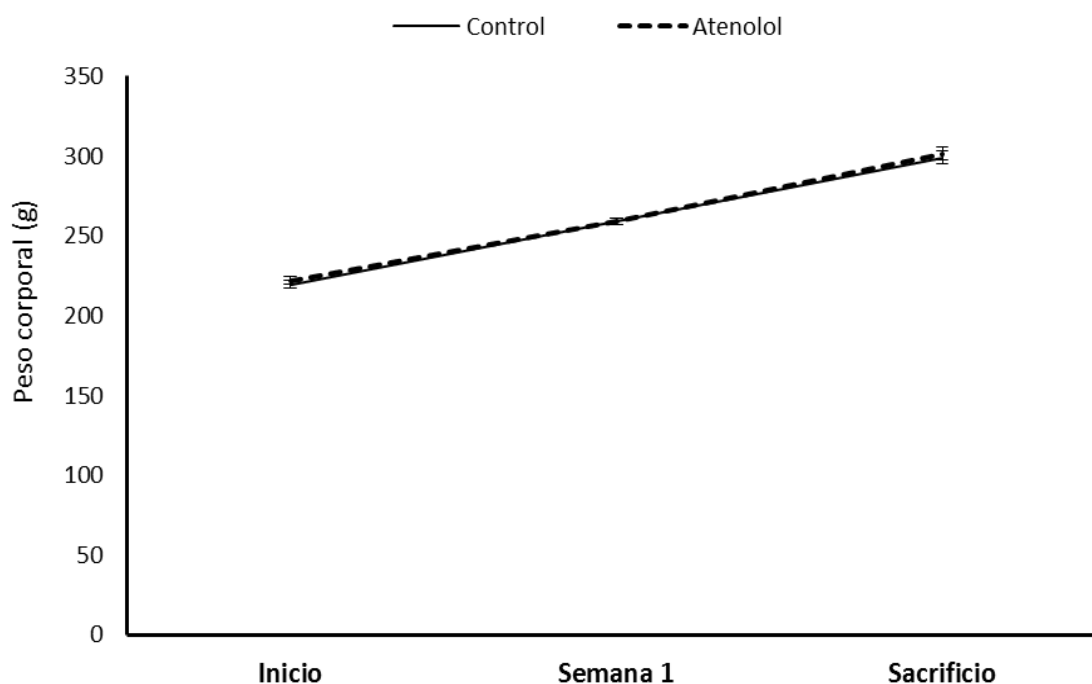
## 1. EFECTO DEL ATENOLOL SOBRE PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO, EL ENVEJECIMIENTO Y LA LONGEVIDAD

- **Modelo 1.1. Efecto agudo del atenolol en corazón de rata Wistar**

### 1.1.1. Peso de animales y órganos

No se observaron diferencias significativas en el peso de los animales al inicio del tratamiento experimental ni al final del mismo, siendo la ganancia de peso progresiva durante las dos semanas del periodo experimental (Figura 27).

Tampoco se observaron diferencias entre grupos en cuanto al peso del corazón, órgano objeto de estudio en este experimento (Tabla 3).



**Figura 27.** Variación del peso corporal (g) durante el periodo experimental de ratas del grupo control y ratas tratadas con atenolol. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

**Tabla 3.** Peso del corazón (g) de las ratas control y tratadas con atenolol.

	Control	Atenolol
<b>Corazón</b>	0.82±0.015	0.83±0.021

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

### **1.1.2. Consumo de oxígeno mitocondrial**

En la Tabla 4. se muestra el efecto del tratamiento con atenolol (1g/l disuelto en el agua de bebida) durante dos semanas sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de corazón de rata. Las medidas se llevaron a cabo en presencia de sustratos del complejo I (glutamato-malato) y del complejo II (succinato) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

En todos los casos la adición de ADP estimuló significativamente el consumo de oxígeno desde el estado no fosforilante (estado 4) al fosforilante (estado 3), indicando así el buen estado y funcionalidad de las preparaciones mitocondriales.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar la intensidad de consumo de oxígeno entre ambos grupos experimentales con ningún sustrato y en ninguno de los dos estados (Tabla 4).

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en el índice de control respiratorio (RCR) con ninguno de los sustratos empleados (Tabla 5), siendo más elevados los valores correspondientes a glutamato-malato.

**Tabla 4.** Tasa de consumo de oxígeno de mitocondrias de corazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol, utilizando como sustratos glutamato-malato y succinato+rotenona en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP.

Sustrato	Control	Atenolol
<b>Glutamato-malato (Estado 4)</b>	60,8 ± 8,3	60,0 ± 4,8
<b>Glutamato-malato (Estado 3)</b>	203,1 ± 30,4	189,2 ± 11,8
<b>Succinato + rotenona (Estado 4)</b>	135,9 ± 9,4	135,1 ± 11,3
<b>Succinato + rotenona (Estado 3)</b>	357,3 ± 22,7	364,2 ± 31,9

Los resultados se expresan en nanomoles de O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

**Tabla 5.** Índice de control respiratorio (RCR) de mitocondrias de corazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol utilizando como sustratos glutamato-malato y succinato+rotenona.

Sustrato	Control	Atenolol
<b>Glutamato-malato</b>	3,5 ± 0,5	3,2 ± 0,3
<b>Succinato + rotenona</b>	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

### **1.1.3. Producción mitocondrial de radicales libres**

El tratamiento con atenolol durante dos semanas no modificó de forma significativa la intensidad de producción basal de radicales libres de mitocondrias de corazón en presencia del sustrato específico del complejo I glutamato-malato, si bien se puede apreciar una ligera tendencia a la disminución de la producción de radicales libres en el grupo tratado con atenolol. Tampoco se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales cuando se estudió la tasa de producción basal de ROS del complejo III, estimada empleando succinato como sustrato y el inhibidor rotenona. Cuando el mismo ensayo se realiza sin rotenona, la

producción de ROS en el complejo III fue más baja que en presencia del inhibidor, posiblemente por un transporte reverso de electrones hacia el complejo I (Tabla 6).

La estimación de las tasas máximas de generación de ROS se llevó a cabo usando combinaciones apropiadas de sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria (Tabla 6). La reducción completa del complejo I se realizó añadiendo rotenona con glutamato-malato como sustrato, mientras que para la del complejo III se utilizó el sustrato succinato con los inhibidores rotenona y antimicina. En ninguno de los dos casos se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los animales control y los tratados con atenolol.

**Tabla 6.** Tasas basales y máximas de producción de  $H_2O_2$  (nmoles de  $H_2O_2$  / min  $\times$  mg proteína mitocondrial) de mitocondrias de corazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol en presencia de sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial.

Sustrato	Control	Atenolol
<b>Glutamato-malato</b>	0,125 $\pm$ 0,02	0,076 $\pm$ 0,02
<b>Succinato</b>	1,08 $\pm$ 0,24	1,37 $\pm$ 0,40
<b>Succinato + rotenona</b>	1,34 $\pm$ 0,25	1,43 $\pm$ 0,26
<b>Glutamato-malato + rotenona</b>	2,67 $\pm$ 0,47	2,98 $\pm$ 0,51
<b>Succinato + rotenona + Antimicina</b>	7,04 $\pm$ 0,85	6,96 $\pm$ 0,83

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

#### **1.1.4. Fuga de radicales libres**

La fuga de radicales libres (%) representa el porcentaje de electrones que se escapan de la cadena respiratoria mitocondrial dando lugar a ROS.

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en este parámetro con glutamato-malato ni con succinato + rotenona (Tabla 7) como sustratos, de acuerdo con la ausencia de diferencias en la producción mitocondrial de ROS y el consumo de oxígeno.



**Tabla 7.** Fuga de radicales libres (%) en mitocondrias de corazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol, en presencia de glutamato-malato o succinato (y rotenona) como sustratos.

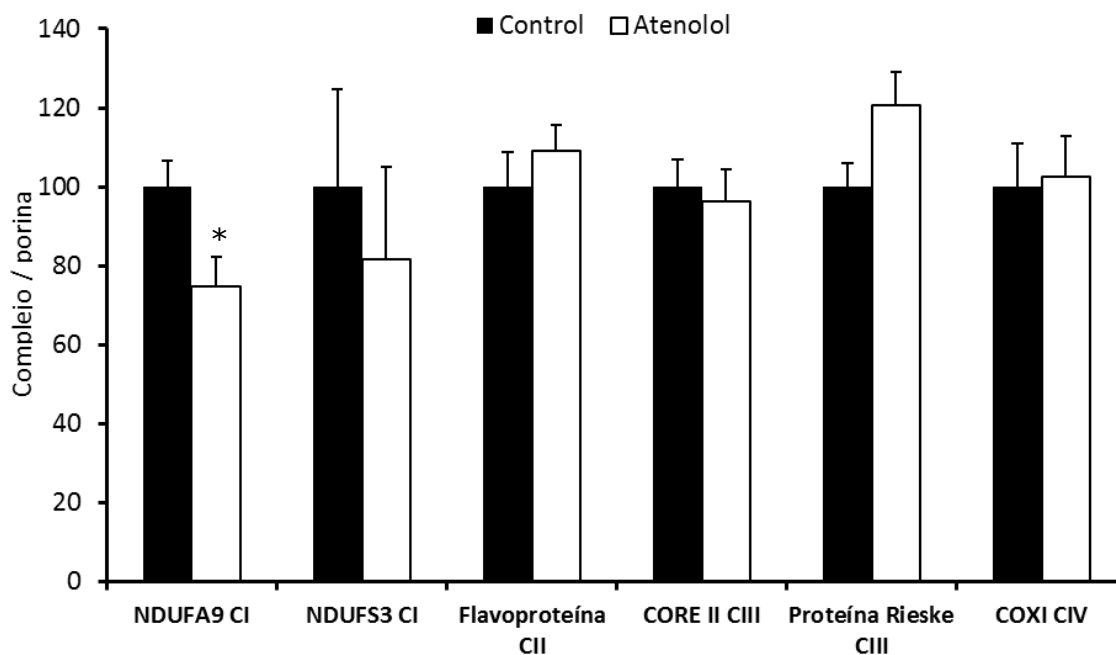
Sustrato	Control	Atenolol
<b>Glutamato-malato</b>	0,11 ± 0,03	0,06 ± 0,01
<b>Succinato + rotenona</b>	0,56 ± 0,13	0,58 ± 0,10

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

#### **1.1.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

En la Figura 28 se muestra la cantidad de los complejos proteicos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

De todos los complejos mitocondriales cuantificados, solo se encontraron diferencias significativas en la subunidad NDUFA9 del complejo I, la cual se presentó significativamente reducida en el grupo de animales tratados con atenolol (25,16 %).



**Figura 28.** Cantidad de los complejos I (sub 39KDa, NDUFA9 y sub 30KDa, NDUF53), II (sub 70KDa, Flavoproteína), III (sub 48KDa, CORE II y sub 29,6 KDa, Centro hierro-sulfurado o proteína Rieske), y IV (sub 57KDa, COXI) de la cadena respiratoria, medida como el cociente de unidades del complejo / unidades de porina, en mitocondrias de corazón de ratas controles y tratadas con atenolol. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 6-7 animales.

#### **1.1.6. Cantidad de las proteínas SOD2, AIF, SIRT 3 y 5**

La cantidad de las proteínas superóxido dismutasa (SOD2), el factor de inducción de apoptosis (AIF) y las sirtuinas 3 y 5 se muestran en la tabla 8. De todas ellas, solamente la MnSOD disminuyó de forma significativa en el grupo de ratas con atenolol en el agua de bebida. No se observaron diferencias significativas para las demás proteínas analizadas.

**Tabla 8.** Cantidad de: SOD2, AIF, SIRT3 y 5 en mitocondrias de coazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol cuantificadas por densitometría como unidades arbitrarias normalizadas para porina

	Control	Atenolol
<b>MnSOD</b>	100 ± 8,59	77,15 ± 5,78*
<b>AIF</b>	100 ± 5,70	98,08 ± 4,37
<b>SIRT3</b>	100 ± 2,69	104,73 ± 1,32
<b>SIRT5</b>	100 ± 10,29	88,70 ± 8,92

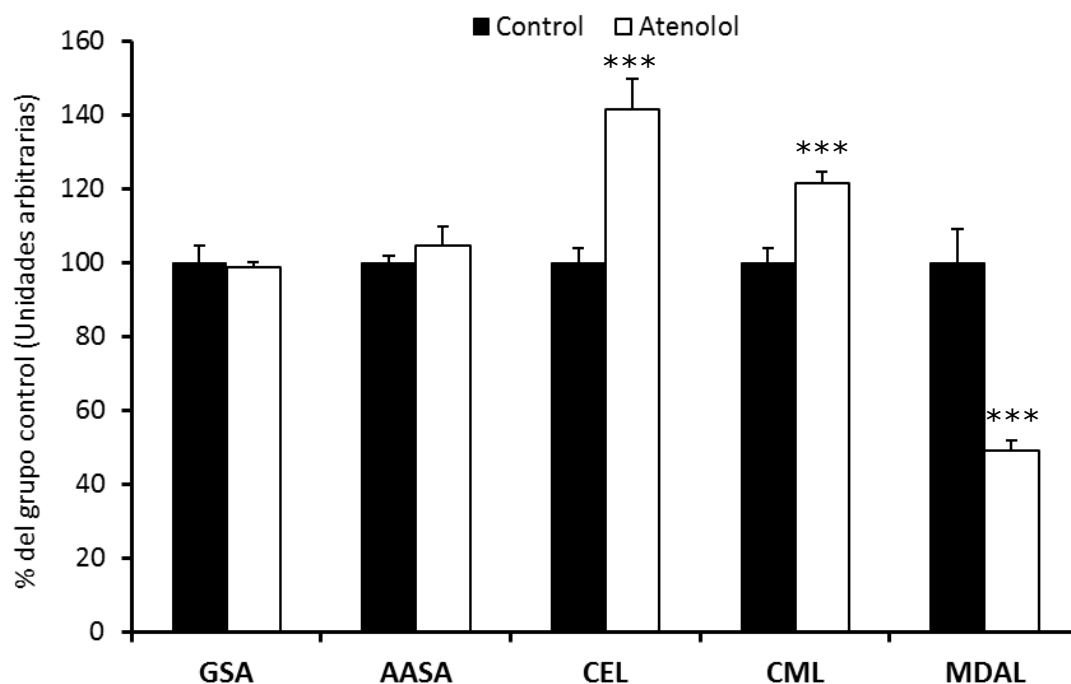
Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*(p < 0,05). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

#### **1.1.7. Daño oxidativo a proteínas**

La figura 29 recoge los distintos marcadores de daño oxidativo (GSA y AASA), glicooxidativo (CEL y CML) y lipooxidativo (MDAL) que se analizaron en las proteínas mitocondriales de corazón de ratas controles y tratadas con atenolol.

Los carbonilos proteicos GSA y AASA no mostraron diferencias respecto al control (p > 0,05), mientras que los marcadores glicooxidativos CEL y CML aumentaron significativamente (p < 0,001) en el grupo tratado con atenolol.

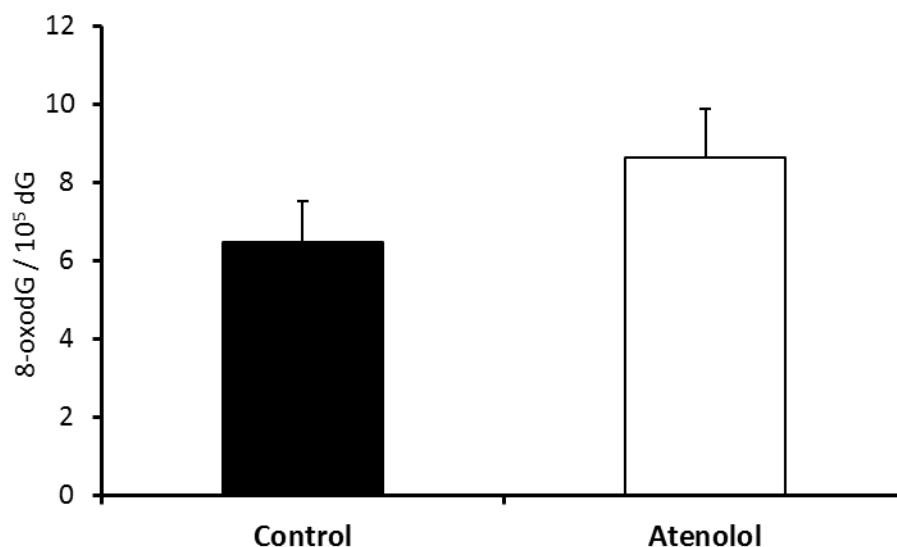
Por otro lado el marcador de daño lipooxidativo MDAL disminuyó de forma significativa (p < 0,001) en los animales con atenolol en el agua de bebida.



**Figura 29.** Marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo en proteínas de mitocondrias de corazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol. Valores del grupo control:  $5277 \pm 238$  (GSA),  $230 \pm 4$  (AASA),  $606 \pm 23$  (CEL)  $1558 \pm 62$  (CML) y  $584 \pm 52$  (MDAL). Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control: \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles} / \text{mol}$  lisina como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

#### **1.1.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial**

El daño oxidativo al ADN mitocondrial se estimó en los distintos grupos experimentales como la razón  $8\text{-oxodG} / 10^5 \text{ dG}$ . Como se puede ver en la Figura 30, no detectamos diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en este valor entre los dos grupos experimentales.



**Figura 30.** Daño oxidativo al ADN mitocondrial (8-oxodG / 10<sup>5</sup> dG) en corazón de ratas controles y tratadas con atenolol. Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

#### **1.1.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales**

En la Tabla 9 se muestra el análisis de la composición de los ácidos grasos en mitocondrias de corazón de rata. El tratamiento con atenolol disminuyó significativamente los niveles de los ácidos esteárico (18:0), araquidónico (20:4n-6), behénico (22:0), adrenico (22:4n-6), docosapentaenoico de las series n-3 y n-6 (22:5n-3 y 22:5n-6), docosahexaenoico (22:6n-3) y lignocérico (24:0), y tan solo aumentó significativamente los niveles del ácido linoleico (18:2n-6) en comparación con el grupo control.

A partir de estos ácidos grasos se calcularon los distintos tipos de ácidos grasos, que se muestran en la Figura 1.5. Así pues, se estudiaron el contenido total en ácidos grasos saturados (SFA) e insaturados (UFA) y, dentro de los insaturados, se analizaron por separado los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y los poliinsaturados (PUFA), desglosando estos últimos en ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 (PUFAn-3) y de la familia n-6 (PUFAn-6). De los tipos de ácidos grasos estudiados, solamente los PUFAn-6 aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en el grupo tratado con atenolol mientras que los PUFAn-3 disminuyeron significativamente ( $p < 0,001$ ) en el mismo grupo experimental (Figura 31).

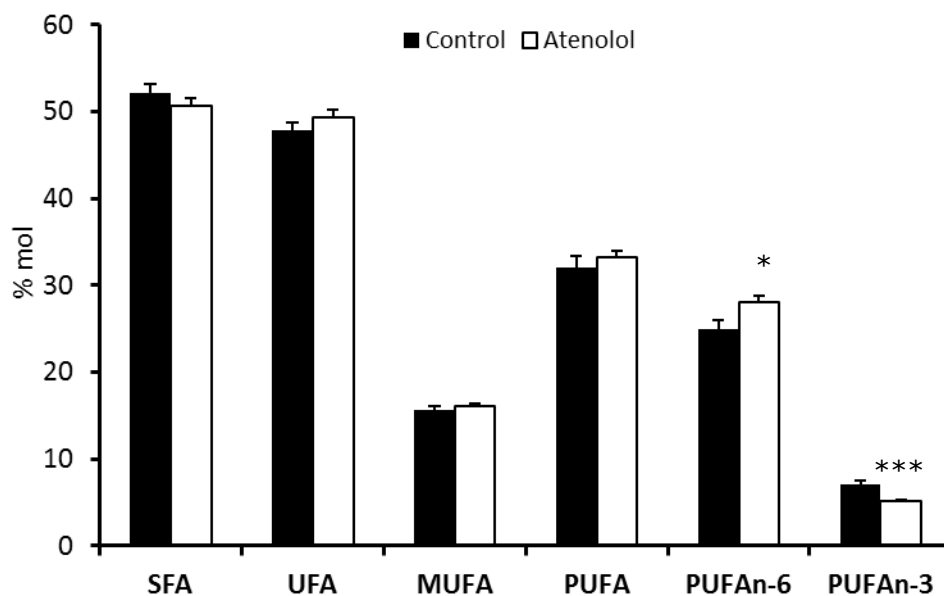
La longitud total de cadena de los ácidos grasos de los lípidos de corazón (ACL) disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en los animales con atenolol en el agua de bebida (Figura 32).

Para analizar la posible variación en el número total de dobles enlaces se calculó el índice de dobles enlaces (DBI). Dicho índice no dio lugar a diferencias significativas entre ambos grupos, sin embargo el índice de peroxidizabilidad lipídica (PI) de los ácidos grasos de corazón, estimación de la susceptibilidad de los mismos a la peroxidación lipídica, sufrió un descenso significativo en el grupo sometido al tratamiento con atenolol ( $p < 0,01$ ) (Figura 33). Este descenso en el PI se debe principalmente al descenso observado en el ácido graso 22:6n-3 y en menor medida en el 20:4n-6; y el aumento del 18:2n-6.

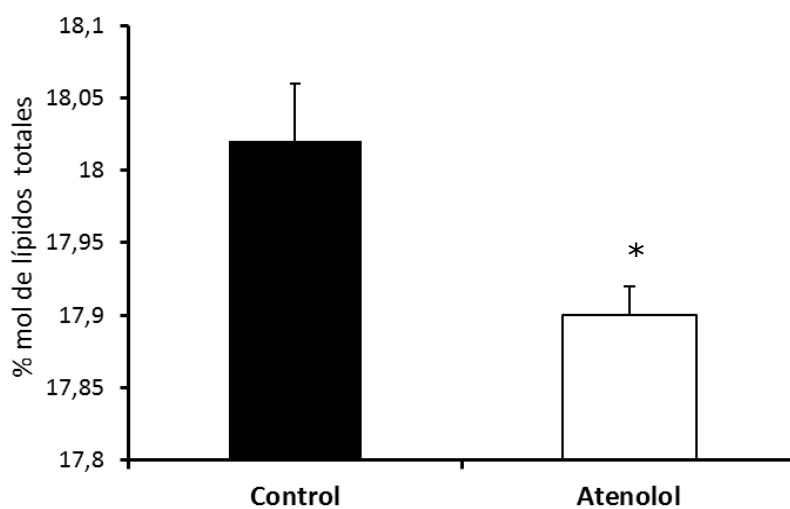
**Tabla 9.** Composición (% mol) de los ácidos grasos de las mitocondrias de corazón de ratas control y tratadas con atenolol.

	Control	Atenolol
14:0	1.29±0.05	1.23±0.05
16:0	24.77±0.77	24.61±0.70
16:1n-7	1.14±0.05	1.18±0.04
18:0	25.45±0.22	24.28±0.22**
18:1n-9	14.29±0.31	14.65±0.24
18:2n-6	10.89±0.55	15.51±0.65***
18:3n-3	0.39±0.01	0.41±0.03
18:4n-3	0.13±0.01	0.13±0.01
20:0	0.18±0.01	0.18±0.01
20:1n-9	0.28±0.05	0.23±0.03
20:2n-6	0.93±0.03	1.01±0.03
20:3n-6	0.76±0.02	0.84±0.03
20:4n-6	11.61±0.48	10.16±0.26*
20:5n-3	0.14±0.01	0.15±0.01
22:0	0.24±0.02	0.19±0.01**
22:4n-6	0.34±0.03	0.23±0.02**
22:5n-6	0.35±0.03	0.20±0.01***
22:5n-3	1.04±0.05	0.88±0.04*
22:6n-3	5.52±0.43	3.69±0.15***
24:0	0.24±0.01	0.20±0.01**

Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

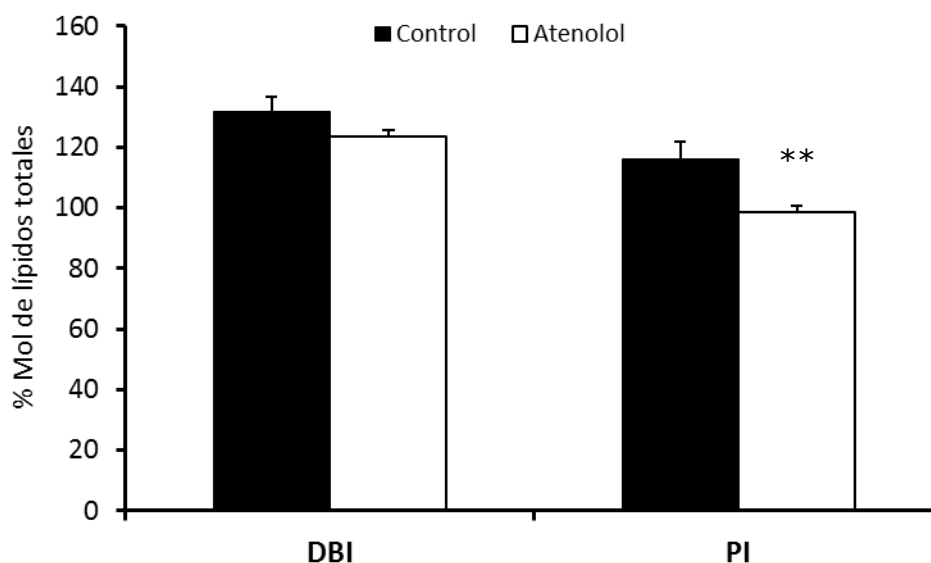


**Figura 31.** Tipos de ácidos grasos de mitocondrias de corazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*(p < 0,05), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM del % de moles de cada fracción de 8 animales.



**Figura 32.** Longitud media de cadena (ACL) de los lípidos de mitocondrias de corazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*(p < 0,05). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales.





**Figura 33.** Índice de dobles enlaces (DBI) e índice de peroxidizabilidad (PI) de los lípidos de mitocondrias de corazón de ratas control y ratas tratadas con atenolol. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; **\*\***( $p < 0,01$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

#### **1.1.10. Estimación de las actividades desaturasa y elongasa**

Las tablas 10 y 11 muestran la estimación de las actividades de las enzimas desaturasas y elongasas.

La actividad desaturasa  $\Delta 9$  (n-9) se incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) en el grupo tratado con atenolol, mientras que la actividad  $\Delta 5$  (n-6) fue significativamente menor ( $p < 0,01$ ). Las actividades integradas de desaturación y elongación n-6 y n-3 fueron también menores en los animales tratados con atenolol ( $p < 0,01$ ).

Las actividades elongasa ELOVL 1/3, ELOVL 5 (n-6), ELOVL 2/5 (n-6) y ELOVL 2/5 (n-3) disminuyeron de forma significativa en el grupo atenolol con respecto al control.

**Tabla 10.** Estimación de las actividades desaturasa en lípidos de mitocondrias de corazón de ratas control y tratadas con atenolol.

DESATURASAS		Control	Atenolol
$\Delta 9$ (n-7)	C16:1/C16:0	0.046±0.001	0.048±0.002
$\Delta 9$ (n-9)	C18:1/C18:0	0.561±0.010	0.604±0.013*
$\Delta 8$ (n-6)	C20:3/C20:2	0.828±0.044	0.846±0.025
$\Delta 5$ (n-6)	C20:4/C20:3	15.387±0.795	12.123±0.493**
n-6#	C22:5/C18:2	0.099±0.009	0.058±0.004**
n-3#	C22:6/C18:3	14.289±1.494	9.141±0.566**

Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*(p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

**Tabla 11.** Estimación de las actividades elongasa en lípidos de mitocondrias de corazón de ratas control y tratadas con atenolol.

ELONGASAS		Control	Atenolol
ELOVL 3 (n-9)	C20:1/C18:1	0.019±0.003	0.015±0.001
ELOVL 6	C18:0/C16:0	1.033±0.029	0.991±0.023
ELOVL 1/3	C20:0/C18:0	0.007±0.001	0.007±0.001
ELOVL 1/3	C22:0/C20:0	1.371±0.048	1.018±0.051***
ELOVL 1/3	C24:0/C22:0	1.392±0.096	1.077±0.036**
ELOVL 5 (n-6)	C20:2/C18:2	0.086±0.004	0.065±0.003**
ELOVL 2/5 (n-6)	C22:4/C20:4	0.028±0.001	0.023±0.001*
ELOVL 2/5 (n-3)	C22:5/C20:5	7.508±0.418	6.071±0.443*

Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*(p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

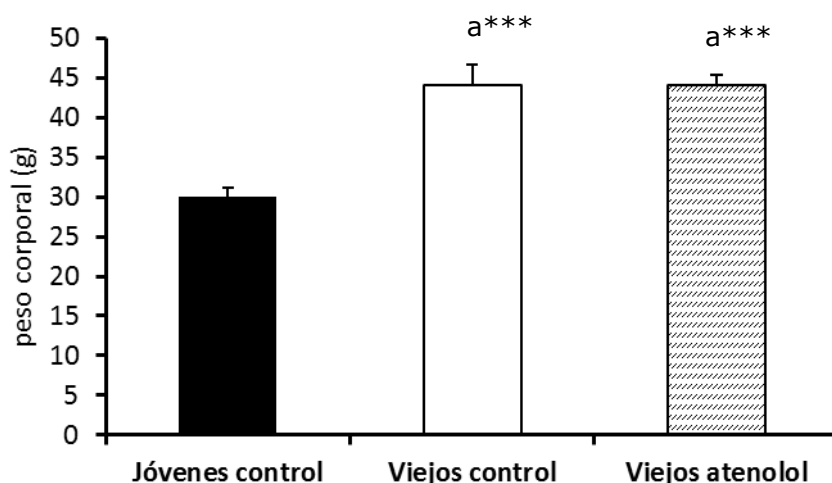
- **Modelo 1.2. Efecto del atenolol en corazón y músculo de ratones B6D2F1 durante todo el ciclo vital.**

### **1.2.1. Peso de animales y órganos**

No se observaron diferencias significativas en el peso de los animales debidas al tratamiento con atenolol, sino únicamente a la diferencia de edad entre los grupos experimentales (Figura 34)

Los pesos de los diferentes órganos se recogen en la tabla 11 Se encontraron diferencias significativas en los ratones viejos comparados con el grupo de jóvenes control en el caso del hígado, corazón, riñón y tejido adiposo visceral, que se vieron incrementados significativamente en los animales viejos.

En el caso del riñón, los animales viejos tratados con atenolol presentaron un riñón significativamente menor al de ambos controles, y el peso del tejido adiposo visceral fue significativamente mayor en los dos grupos de ratones viejos comparados con los jóvenes, pero este efecto de la edad se previno con el tratamiento con atenolol. De este modo, el tratamiento con atenolol fue capaz de disminuir el tamaño del bazo, así como el peso del tejido adiposo visceral.



**Figura 34.** Peso corporal (g) en el momento del sacrificio de los animales jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 24 animales. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control; \*\*\*( $p < 0,001$ ).

**Tabla 11.** Peso de los órganos (g) de los animales jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol.

	Jóvenes Control	Viejos control	Viejos atenolol
<b>Hígado</b>	1,60 ± 0,05	2,07 ± 0,07 <sup>a***</sup>	1,95 ± 0,5 <sup>a***</sup>
<b>Corazón</b>	0,16 ± 0,006	0,22 ± 0,005 <sup>a***</sup>	0,23 ± 0,006 <sup>a***</sup>
<b>Bazo</b>	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,005 <sup>a***</sup>
<b>Riñón</b>	0,35 ± 0,01	0,65 ± 0,02 <sup>a***</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>a***, b**</sup>
<b>Cerebro</b>	0,42 ± 0,005	0,43 ± 0,008	0,42 ± 0,007
<b>Tejido adiposo visceral</b>	0,44 ± 0,05	2,30 ± 0,2 <sup>a***</sup>	1,75 ± 0,2 <sup>a***; b*</sup>
<b>Músculo</b>	0,66 ± 0,03	0,67 ± 0,02	0,65 ± 0,02

Los resultados se expresan como la media ± SEM de 24 animales. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001).

### **1.2.2. Parámetros fisiológicos: Temperatura rectal, tasa metabólica, presión sanguínea y frecuencia cardíaca**

Los valores correspondientes a los parámetros fisiológicos basales medidos a los 16-18 meses de edad se muestran en la tabla 12. Los animales viejos tratados con atenolol mostraron menor tasa metabólica de rutina que los ratones jóvenes, pero no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales viejos. Tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguno de los demás parámetros medidos (temperatura rectal, frecuencia cardíaca o presión sanguínea) debidas a la edad ni al tratamiento con atenolol.

**Tabla 12.** Parámetros fisiológicos básicos en ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol, a los 16-18 meses de edad.

	Jóvenes Control	Viejos control	Viejos atenolol
<b>Tasa metabólica de rutina</b>	4.18±0.33	3.54±0.28	3.15±0.30 <sup>a*</sup>
<b>Temperatura rectal (°C)</b>	35.86±0.48	35.35±0.15	35.7±0.25
<b>Frecuencia cardíaca (Pulsaciones/min)</b>	624.6±31.1	642.4±16.9	629.8±16.6
<b>Presión arterial sistólica</b>	235.1±11.5	225.2±4.3	232.1±2.7
<b>Presión arterial media</b>	215.8±11.1	199.1±6.8	209.7±2.9
<b>Presión arterial diastólica</b>	206.5±11.1	186.5±9.3	199.0±3.6

Los resultados se expresan como la media ± SEM de 10 animales. Los animales viejos tenían 16-18 meses de edad cuando se tomaron las medidas. Las unidades de la tasa metabólica de rutina: ml O<sub>2</sub>/min.g; presión sanguínea: mm de Hg. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control; \* (p < 0,05).

### **1.2.3. Consumo de oxígeno mitocondrial**

En la Tabla 13 se reflejan los valores del consumo de oxígeno de mitocondrias de corazón y músculo de ratones jóvenes y viejos control (JC y VC) así como de viejos tratados con atenolol (VA). Como se puede apreciar, mientras que el consumo de oxígeno mitocondrial con glutamato en el estado 4 fue similar en todos los grupos, en el estado 3 el consumo fue significativamente mayor en el grupo de viejos control con respecto a los otros dos grupos en mitocondrias de corazón (p < 0,05 en todos los casos). En mitocondrias de corazón, no se observaron diferencias en ninguno de los dos estados con succinato como sustrato, y en el caso de mitocondrias de músculo no se detectaron diferencias significativas con ningún sustrato y en ningún estado (p > 0,05).

Respecto al RCR (Tabla 14), en el caso de mitocondrias de corazón, se observó un incremento significativo (p < 0,01) en los animales viejos control comparados con los jóvenes control, pero en ningún caso el tratamiento con atenolol modificó este parámetro. No se observaron diferencias significativas en el RCR entre ninguno de los grupos en mitocondrias de músculo.

**Tabla 13.** Consumo de oxígeno en mitocondrias de corazón y músculo de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol, utilizando como sustrato glutamato-malato y succinato (y rotenona) en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP.

Sustrato	Corazón			Músculo		
	JC	VC	VA	JC	VC	VA
<b>Glutamato-malato (Estado 4)</b>	65,9±6,7	70,4±8,0	56,5±5,3	53,4±6,2	45,5±6,8	48,0±3,5
<b>Glutamato-malato (Estado 3)</b>	131,9±19,5	214,9±28,8 <sup>a*</sup>	143,8±13,8 <sup>b*</sup>	140,4±24,2	147,9±19,8	134,8±26,0
<b>Succinato + rotenona (Estado 4)</b>	101,3±6,7	100,2±10,7	95,5±6,6	61,6±11,0	62,3±5,5	61,1±6,8
<b>Succinato + rotenona (Estado 3)</b>	215,8±26,8	270,4±21,2	229,5±25,5	125,9±18,1	158,3±20,2	125,0±13,3

Los resultados se expresan en nanomoles de O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial. Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*(p < 0,05). Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

**Tabla 14.** Índice de control respiratorio (RCR) en mitocondrias de corazón y músculo de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol utilizando glutamato-malato y succinato + rotenona como sustrato.

Sustrato	Corazón			Músculo		
	JC	VC	VA	JC	VC	VA
<b>Glutamato-malato (Estado 4)</b>	2,0±0,2	3,0±0,2 <sup>a**</sup>	2,6±0,2	2,5±0,2	3,1±0,3	2,9±0,2
<b>Succinato + rotenona (Estado 3)</b>	2,0±0,1	2,9±0,3 <sup>a**</sup>	2,4±0,1	2,2±0,2	2,5±0,3	2,1±0,1

Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control; \*\*\*(p < 0,01). Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

#### **1.2.4. Producción mitocondrial de radicales libres**

En corazón de ratón, el tratamiento a largo plazo con atenolol no dio lugar a diferencias en la producción basal de radicales libres en el complejo I con glutamato-malato como sustrato (Tabla 15). Sin embargo, el aumento significativo de la producción de ROS con glutamato-malato en presencia del inhibidor rotenona, que se observa en los viejos control, desaparece en viejos tratados con atenolol.

En el caso de mitocondrias de músculo, se detectó un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en la producción basal de ROS en el complejo I (glutamato-malato como sustrato) en el grupo de viejos tratados con atenolol con respecto a los jóvenes. Cuando se midió la producción máxima de este complejo con glutamato-malato y rotenona, la producción de ROS fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en los viejos tratados con atenolol respecto a ambos controles.

La tasa de producción basal de ROS por parte del complejo III (con succinato y rotenona) no varió entre ninguno de los tres grupos ni en mitocondrias de corazón ni de músculo (Tabla 15). Cuando los ensayos con succinato se llevaron a cabo en ausencia de rotenona en mitocondrias de músculo (permitiendo así el flujo reverso de electrones hacia el complejo I), los niveles de producción de radicales libres fueron mayores que en los ensayos realizados en presencia de rotenona detectándose además una mayor producción de ROS ( $p < 0,05$ ) en los viejos tratados con atenolol con respecto a los jóvenes.

**Tabla 15.** Tasas basales y máximas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de corazón y músculo de ratones jóvenes, viejos control y viejos tratados con atenolol, en presencia de sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial.

Sustrato	Corazón			Músculo		
	JC	VC	VA	JC	VC	VA
<b>Glutamato-malato</b>	0,33±0,04	0,26±0,05	0,26±0,05	0,41±0,02	0,42±0,03	0,34±0,03a*
<b>Succinato</b>	-	-	-	2,44±0,18	1,97±0,35	2,07±0,14a*
<b>Succinato + rotenona</b>	1,08±0,21	1,02±0,15	0,99±0,16	0,88±0,12	0,88±0,08	0,83±0,09
<b>Glutamato/malato + rotenona</b>	1,30±0,12	1,67±0,14 <sup>a*</sup>	1,40±0,11	1,40±0,08	1,49±0,18	1,13±0,08a*,b*

Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*(p < 0,05). Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

#### 1.2.5. Fuga de radicales libres

El tratamiento a largo plazo con atenolol no generó diferencias significativas (p > 0,05) en la fuga de radicales libres con ninguno de los sustratos empleados ni en ninguno de los dos órganos (corazón y músculo) estudiados. Los resultados se reflejan en la tabla 16.

**Tabla 16.** Fuga de radicales libres (%) en mitocondrias de corazón y músculo de ratón, en presencia de glutamato-malato o succinato (y rotenona) como sustratos.

Sustrato	Corazón			Músculo		
	JC	VC	VA	JC	VC	VA
<b>Glutamato-malato</b>	0,26±0,04	0,19±0,06	0,26±0,06	0,40±0,06	0,43±0,04	0,38±0,05
<b>Glutamato/malato + rotenona</b>	0,58±0,08	0,59±0,09	0,59±0,16	0,88±0,2	0,73±0,12	0,87±0,14

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

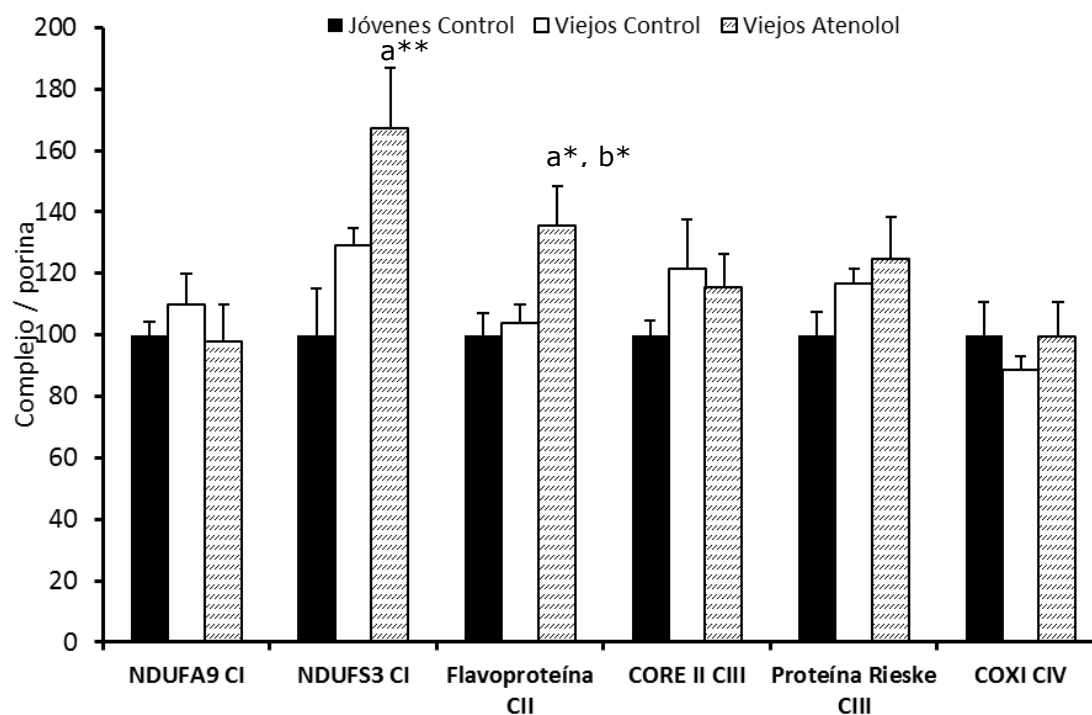


#### **1.2.6. Cantidad de complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

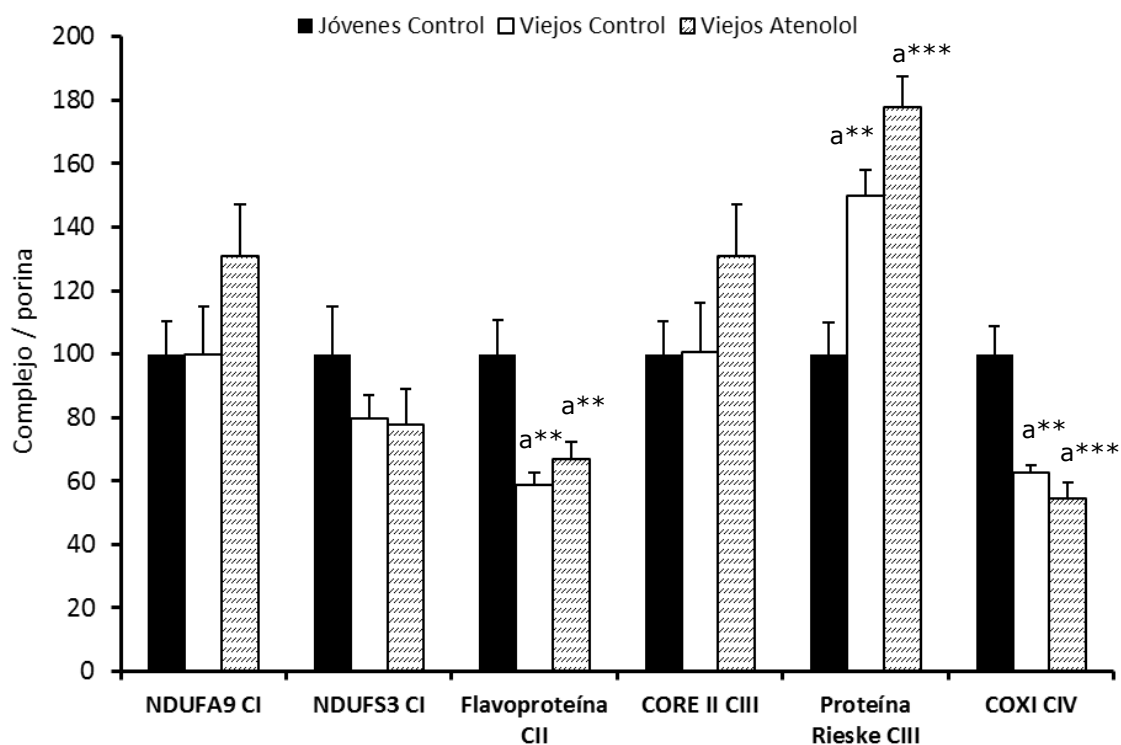
La cantidad de los complejos proteicos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en corazón y músculo de ratones viejos y jóvenes controles y viejos tratados con atenolol se muestra en las Figuras 35 y 35.

En mitocondrias de corazón se detectó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de la subunidad NDUF3 en los animales viejos tratados con atenolol con respecto a los jóvenes, y en este mismo grupo aumentó también significativamente ( $p < 0,05$ ) la flavoproteína del complejo II con respecto a ambos controles.

En el caso de mitocondrias de músculo, se produjo un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) de la flavoproteína (subunidad de 70KDa) del complejo II en los dos grupos de animales viejos en comparación con los jóvenes. La mayor abundancia del complejo III, se detectó con el anticuerpo específico para la proteína Rieske (o proteína hierro-sulfurada) también en los dos grupos de animales viejos con respecto a los jóvenes. Sin embargo, el complejo IV fue significativamente menos abundante ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ) en los dos grupos de animales viejos comparados con los jóvenes.



**Figura 35.** Cantidad de los complejos I (sub 39KDa, NDUF9 y sub 30KDa, NDUF33), II (sub 70KDa, Flavoproteína), III (sub 48KDa, CORE II y sub 29,6 KDa, Centro hierro-sulfurado o proteína Rieske), y IV (sub 57KDa, COXI) de la cadena respiratoria, medida como el cociente de unidades del complejo / unidades de porina, en mitocondrias de corazón de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 4 animales.



**Figura 36.** Cantidad de los complejos I (sub 39KDa, NDUF9 y sub 30KDa, NDUF3), II (sub 70KDa, Flavoproteína), III (sub 48KDa, CORE II y sub 29,6 KDa, Centro hierro-sulfurado o proteína Rieske), y IV (sub 57KDa, COXI) de la cadena respiratoria, medida como el cociente de unidades del complejo / unidades de porina, en mitocondrias de músculo de ratones jóvenes y viejos controles y ratones viejos tratados con atenolol. Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 4 animales.

### **1.2.7. Cantidad de AIF y ERK/ p-ERK**

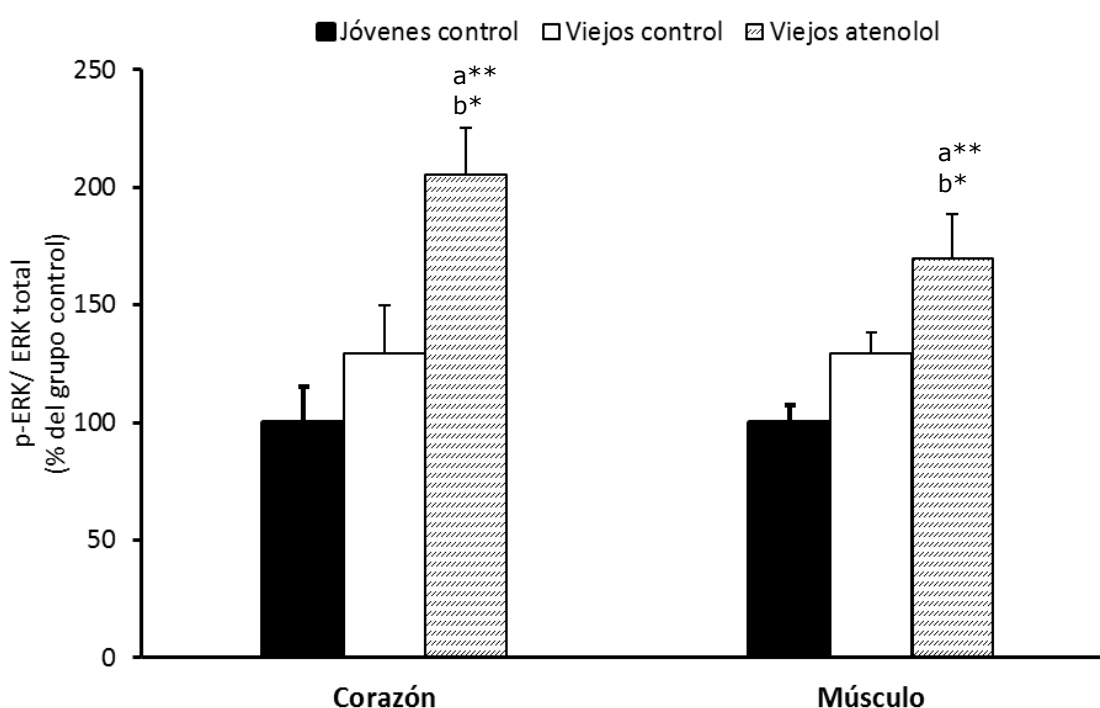
En la tabla 17 se muestran las cantidades del factor inductor de apoptosis AIF en corazón y músculo esquelético de ratones jóvenes y viejos control y viejos tratados con atenolol. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales en este parámetro.

Las cantidades de las proteínas ERK se reflejan en la Figura 37 El tratamiento con atenolol incrementó significativamente la cantidad de p-ERK/ERK total en corazón y en músculo esquelético comparado tanto con los jóvenes como con los viejos control.

**Tabla 17.** Cantidad de AIF cuantificada por densitometría como unidades arbitrarias normalizadas para porina (AIF) en corazón y músculo de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol.

	Corazón			Músculo		
	JC	VC	VA	JC	VC	VA
<b>AIF</b>	100±4,89	106,51±6,77	103,7±11	100±5,75	96,11±10,63	75,8±6,9

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.



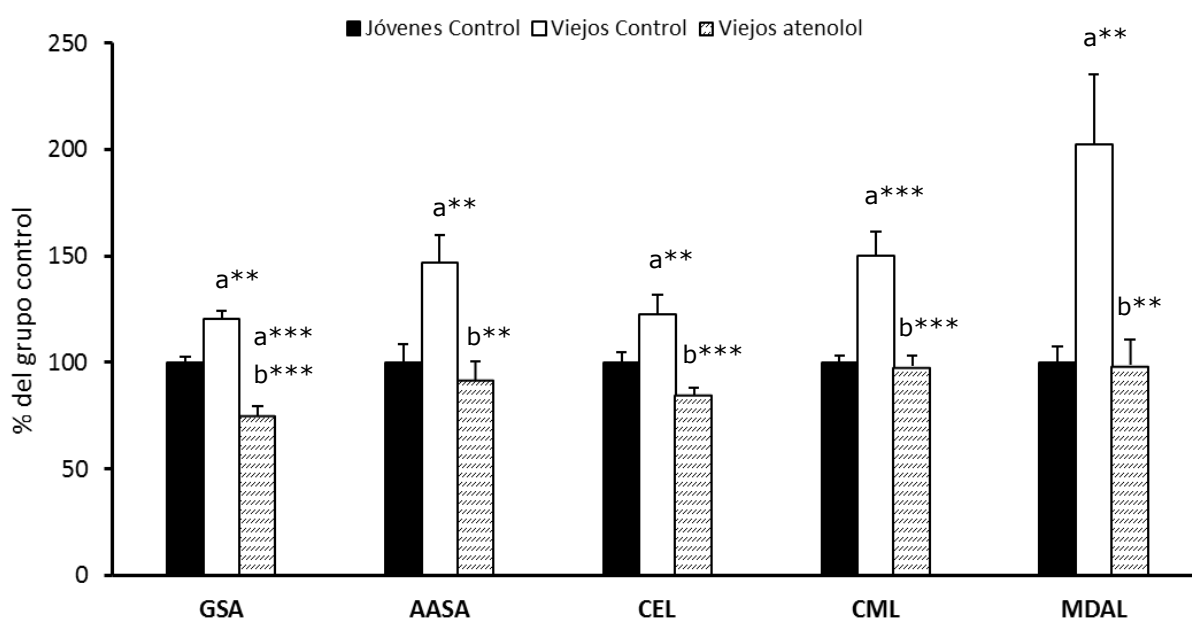
**Figura 37.** Cantidad de proteína ERK y p-ERK en corazón y músculo de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01). Los valores representan la media ± SEM de 4 animales.

### 1.2.8. Daño oxidativo a proteínas

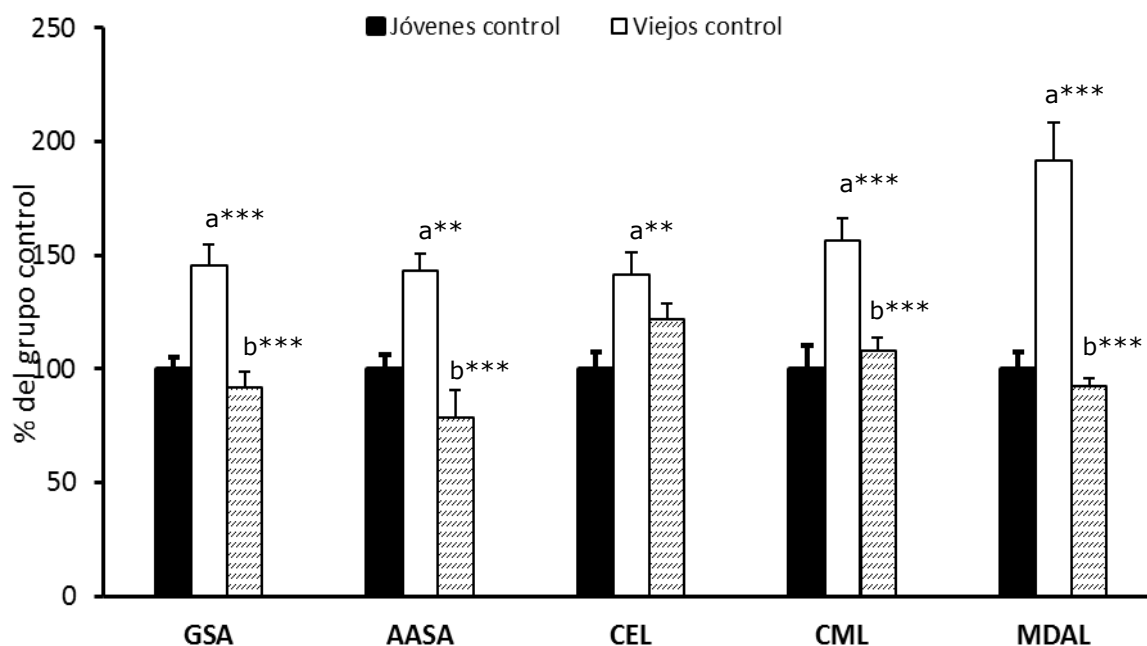
En las figuras 38 y 39 se recogen los distintos marcadores de oxidación, lipooxidación y glicooxidación en proteínas de corazón y músculo de ratones B6D2F1 jóvenes y viejos control, y viejos sometidos a tratamiento con atenolol durante toda su vida.

En el caso de mitocondrias de corazón, se observa un aumento significativo ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ), asociado a la edad de todos los marcadores de daño oxidativo a proteínas analizados en el grupo de viejos control comparado con los jóvenes. Así mismo se detecta que el tratamiento a largo plazo con atenolol fue capaz de revertir estos niveles de forma significativa ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) hasta valores similares o incluso menores (como es el caso del GSA) que los correspondientes al grupo de ratones jóvenes control.

Algo parecido ocurrió en el caso de mitocondrias de músculo. Todos los marcadores de oxidación a proteínas aumentaron significativamente ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) con la edad en el grupo de ratones viejos control, y todos ellos descendieron significativamente ( $p < 0,01$ ) hasta alcanzar valores similares a los del grupo control cuando los ratones fueron tratados con atenolol durante toda su vida, excepto en el caso del marcador de daño glicooxidativo CEL, donde el descenso observado en ratones viejos tratados con atenolol no alcanzó la significación estadística ( $p > 0,05$ ).



**Figura 38.** Marcadores de estrés oxidativo, glicooxidativo y lipooxidativo en proteínas de mitocondrias de corazón de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Valores del grupo de jóvenes control:  $3173 \pm 87$  (GSA),  $295 \pm 24$  (AASA),  $455 \pm 22$  (CEL)  $692 \pm 20$  (CML) y  $805 \pm 59$  (MDAL). Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles} / \text{mol lisina}$  como la media  $\pm$  SEM de 6 animales.

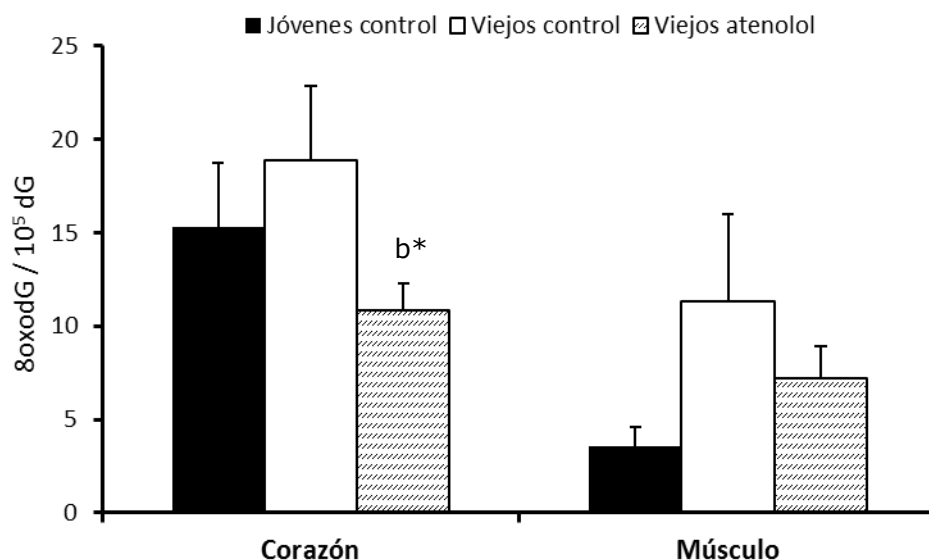


**Figura 39.** Marcadores de estrés oxidativo, glicooxidativo y lipooxidativo en proteínas de mitocondrias de músculo de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Valores del grupo de jóvenes control:  $3028 \pm 151$  (GSA),  $322 \pm 21$  (AASA),  $268 \pm 20$  (CEL)  $491 \pm 49$  (CML) y  $392 \pm 29$  (MDAL). Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles} / \text{mol lisina}$  como la media  $\pm$  SEM de 6 animales.

### **1.2.9. Daño oxidativo al ADN mitocondrial**

Como se aprecia en la Figura 40, en corazón el daño oxidativo al ADN mitocondrial, estimado como el cociente  $8\text{-oxodG} / 10^5 \text{ dG}$ , fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en los animales viejos tratados con atenolol con respecto a los viejos control. En este órgano los animales viejos control presentaron una tendencia a incrementar los niveles de oxidación en el ADN mitocondrial con respecto a los jóvenes que no alcanzó la significación ( $p > 0,05$ ), así como el descenso que provocó el tratamiento con el fármaco tampoco resultó significativo al comparar los animales viejos tratados con los jóvenes control.

En el caso del músculo, se repitió el mismo patrón que en corazón: los niveles de oxidación tendieron a aumentar con la edad y a revertir con el tratamiento a largo plazo con atenolol, pero en ese caso los valores obtenidos no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 40.** Daño oxidativo al ADN mitocondrial (8-oxodG /  $10^5$  dG) en corazón y músculo de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>b</sup>viejos control; \* ( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

#### **1.2.10. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales**

La composición de ácidos grasos en mitocondrias de corazón se muestra en la tabla 18. En el grupo de ratones viejos control, se detectó un aumento significativo en los ácidos grasos esteárico (18:0), dihomo- $\gamma$ -linoleico (20:3n-6) y docohexaenoico (22:6n-3), y un descenso en el ácido graso monoinsaturado 16:1n-7, el oleico (18:1n-9), araquidónico (20:4n-6), eicosapentaenoico (20:5n-3), behénico (22:0), adrenico (22:4n-6), lignocérico (24:0), tetracosapentaenoico (24:5n-3) y tetracosahexaenoico (24:6n-3) respecto a los jóvenes control. Los animales viejos tratados con atenolol a largo plazo mostraron niveles más altos de los ácidos grasos oleico (18:1n-9), adrenico (20:4n-6) y tetracosapentaenoico (24:5n-3), y más bajos de 14:0, dihomo- $\gamma$ -linoleico (20:3n-6) y docosahexaenoico (22:6n-3) que los viejos control. El esteárico (18:0) aumentó y el ácido graso monoinsaturado 16:1n-7, el eicosapentaenoico (20:5n-3), behénico (22:0), lignocérico (20:4) y tetracosapentaenoico (24:5n-3) disminuyeron en los viejos tratados con atenolol comparados con los jóvenes control. En mitocondrias de músculo esquelético, los ratones viejos control mostraron niveles mayores de ácido

docosahexaenoico 22:6n-3 y menores de oleico (18:1n-9), araquidónico (20:4n-6), docosapentaenoico (22:5n-3) y tetracosapentaenoico (24:5n-3) que los jóvenes control (Tabla 19). En los viejos tratados con atenolol se observó un aumento en el ácido oleico (18:1n-9) y en el eicosadienoico (20:2n-6) y un descenso en el docosahexaenoico (22:6n-3) respecto a los viejos control. El 16:0 aumentó, mientras que el linoléico (18:2n-6), el araquidónico (20:4n-6), el docosapentaenoico (22:5n-3), el docosahexaenoico (22:6n-3) y el tetracosapentaenoico (24:5n-3) disminuyeron en los viejos tratados con atenolol comparados con los jóvenes control.

Posteriormente, se calcularon los distintos tipos de ácidos grasos tanto en mitocondrias de corazón como de músculo que se muestran en las Figura 41 y 42 respectivamente. Así pues, se estudiaron el contenido total en ácidos grasos saturados (SFA) e insaturados (UFA) y, dentro de los insaturados, se analizaron por separado los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y los poliinsaturados (PUFA). Dentro de estos últimos, distinguimos dos fracciones más: ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 (PUFAn-3) y de la familia n-6 (PUFAn-6).

En corazón de ratón, todas las fracciones lipídicas estudiadas fueron similares en los tres grupos experimentales ( $p > 0,05$ ) excepto los MUFA, que descendieron significativamente en el grupo de ratones viejos control ( $p < 0,01$ ) comparado con los ratones jóvenes control, y aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) en el grupo de ratones tratados con atenolol alcanzando valores similares al grupo de ratones jóvenes. Los PUFAn-3 aumentaron significativamente en los viejos control ( $p < 0,01$ ) y el efecto se revirtió tras el tratamiento con el fármaco descendiendo de forma significativa ( $p < 0,01$ ) en los viejos tratados con atenolol (Figura 41). Estos cambios se deben principalmente al aumento significativo del ácido graso 18:1n-9 y el descenso, también significativo, del 22:6n-3 en los viejos tratados con atenolol respecto a los viejos control.

En músculo esquelético, los MUFA aumentaron en los ratones tratados con atenolol mientras que en el mismo grupo los PUFA disminuyeron significativamente ( $p < 0,01$ ) en ambos casos con respecto a los ratones viejos control. Los PUFAn-6 disminuyeron en los dos grupos de ratones viejos con respecto a los jóvenes ( $p < 0,05$ ) y los PUFAn-3 aumentaron en los viejos control con respecto a los jóvenes mientras que el tratamiento con atenolol fue capaz de disminuir significativamente este parámetro en comparación con los dos grupos control (Figura 42). En este caso, los cambios se



producen de nuevo gracias al aumento del ácido graso 18:1n-9 tras el tratamiento con atenolol; y el descenso del 22:6n-3 en los ratones tratados con el fármaco.

Por su parte, la longitud media de cadena de los ácidos grasos (ACL) no mostró diferencias entre ninguno de los grupos en mitocondrias de corazón pero en el caso de mitocondrias de músculo este parámetro disminuyó significativamente en los ratones tratados con atenolol con respecto a los dos grupos control (Figura 43).

La variación en el número total de dobles enlaces se calculó como el índice de dobles enlaces (DBI), que aumentó en los animales viejos en los dos órganos estudiados siendo significativo este aumento en el caso de las mitocondrias de corazón. El tratamiento con atenolol revirtió el efecto de la edad reduciendo los niveles de forma significativa en los animales tratados respecto a los viejos control (en corazón) y a ambos controles en el caso del músculo. El índice de peroxidizabilidad lipídica (PI) de los ácidos grasos se vio incrementado significativamente ( $p < 0.05$ ) en el grupo de viejos control comparado con los jóvenes en ambos órganos, disminuyendo en los ratones tratados a largo plazo con el fármaco con respecto a los viejos control en ambos tejidos, y a los jóvenes en el caso del músculo esquelético (Figura 44).

**Tabla 17.** Composición (% mol) de los ácidos grasos de las mitocondrias de corazón de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol.

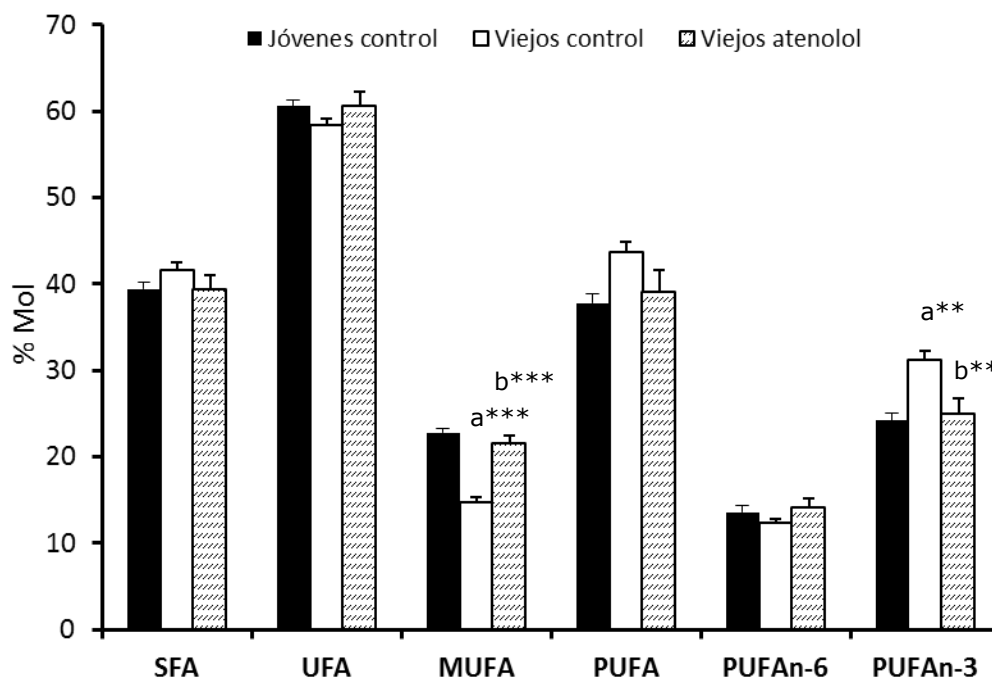
	Jóvenes control	Viejos control	Viejos atenolol
14:0	1.09±0.13	1.63±0.31	1.06±0.17 <sup>b*</sup>
16:0	20.47±1.04	20.27±0.51	18.84±0.90
16:1n-7	2.67±0.62	1.39±0.15 <sup>a*</sup>	0.96±0.06 <sup>a**</sup>
18:0	15.63±1.26	18.64±0.69 <sup>a*</sup>	18.50±0.68 <sup>a*</sup>
18:1n-9	19.46±0.65	12.85±0.76 <sup>a***</sup>	20.00±0.97 <sup>b***</sup>
18:2n-6	7.47±0.69	6.23±0.43	7.90±1.10
18:3n-3	0.41±0.08	0.31±0.05	0.28±0.04
18:4n-3	0.77±0.19	0.67±0.13	0.60±0.13
20:0	0.52±0.16	0.28±0.03	0.33±0.03
20:1n-9	0.66±0.11	0.50±0.06	0.56±0.04
20:2n-6	0.52±0.06	0.59±0.08	0.48±0.06
20:3n-6	0.34±0.03	1.61±0.19 <sup>a***</sup>	0.28±0.02 <sup>b***</sup>
20:4n-6	4.33±0.42	3.17±0.31 <sup>a*</sup>	4.68±0.06 <sup>b**</sup>
20:5n-3	0.36±0.06	0.19±0.02 <sup>a*</sup>	0.19±0.02 <sup>a**</sup>
22:0	0.34±0.01	0.22±0.03 <sup>a*</sup>	0.23±0.03 <sup>a*</sup>
22:4n-6	0.40±0.05	0.31±0.02 <sup>a*</sup>	0.32±0.01
22:5n-6	0.50±0.03	0.41±0.03	0.47±0.04
22:5n-3	1.90±0.33	1.73±0.14	1.67±0.18
24:0	1.33±0.30	0.56±0.06 <sup>a**</sup>	0.69±0.06 <sup>a*</sup>
22:6n-3	19.92±0.77	28.03±1.01 <sup>a***</sup>	21.56±1.74 <sup>b**</sup>
24:4n-3	0.53±0.05	0.18±0.04 <sup>a***</sup>	0.41±0.04 <sup>a*, b**</sup>
24:6n-3	0.26±0.03	0.15±0.01 <sup>a*</sup>	0.21±0.02

Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

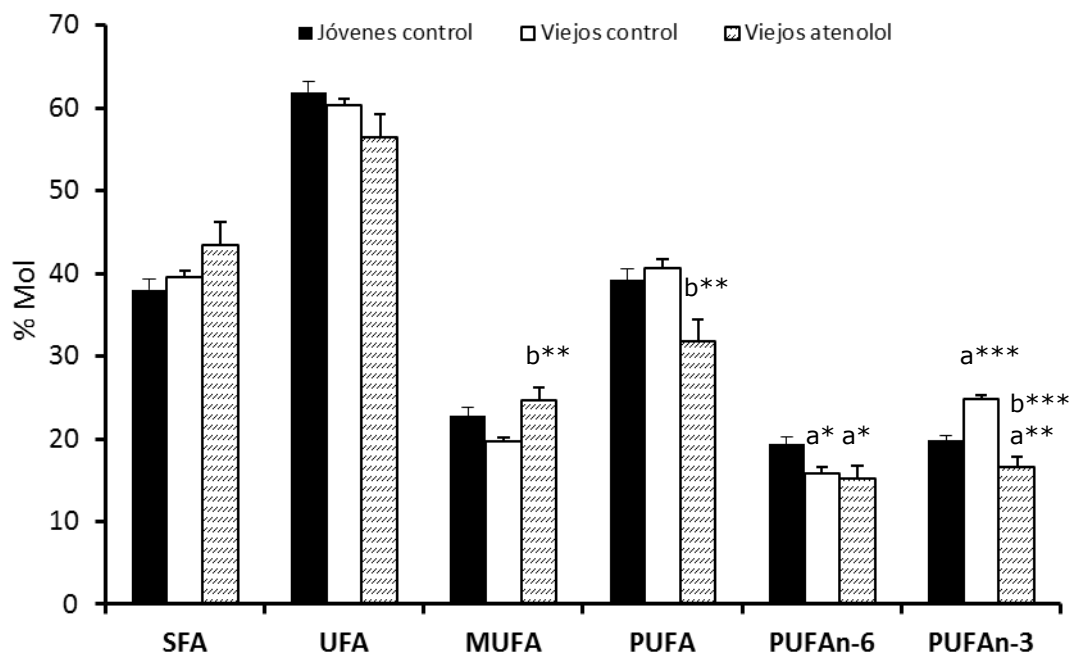
**Tabla 18.** Composición (% mol) de los ácidos grasos de las mitocondrias de músculo esquelético de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol.

	Jóvenes control	Viejos control	Viejos atenolol
14:0	1.10±0.08	1.32±0.21	1.43±0.11
16:0	22.03±0.86	22.94±0.34	25.23±0.97 <sup>a*</sup>
16:1n-7	2.71±0.08	2.87±0.13	3.00±0.29
18:0	13.70±0.57	14.16±0.82	15.58±1.74
18:1n-9	19.52±1.08	16.39±0.47 <sup>a*</sup>	21.27±1.44 <sup>b**</sup>
18:2n-6	12.37±0.71	10.54±0.82	9.27±1.33 <sup>a*</sup>
18:3n-3	0.42±0.06	0.43±0.03	0.60±0.15
18:4n-3	0.57±0.10	0.66±0.10	0.67±0.11
20:0	0.26±0.02	0.29±0.06	0.31±0.04
20:1n-9	0.52±0.13	0.46±0.04	0.42±0.02
20:2n-6	0.65±0.04	0.60±0.12	0.92±0.12
20:3n-6	1.33±0.04	1.37±0.17	1.77±0.26
20:4n-6	4.11±0.31	2.53±0.17 <sup>a***</sup>	2.58±0.19 <sup>a***</sup>
20:5n-3	0.23±0.01	0.23±0.03	0.20±0.03
22:0	0.24±0.03	0.20±0.01	0.21±0.04
22:4n-6	0.39±0.04	0.35±0.05	0.30±0.02
22:5n-6	0.46±0.05	0.42±0.04	0.36±0.03
22:5n-3	2.31±0.10	1.77±0.17	1.56±0.11 <sup>a***</sup>
24:0	0.69±0.09	0.67±0.11	0.66±0.08
22:6n-3	15.62±0.48	21.29±0.53 <sup>a***</sup>	13.15±1.12 <sup>a*, b***</sup>
24:4n-3	0.37±0.08	0.21±0.02 <sup>a*</sup>	0.19±0.03 <sup>a*</sup>
24:6n-3	0.27±0.05	0.21±0.01	0.21±0.02

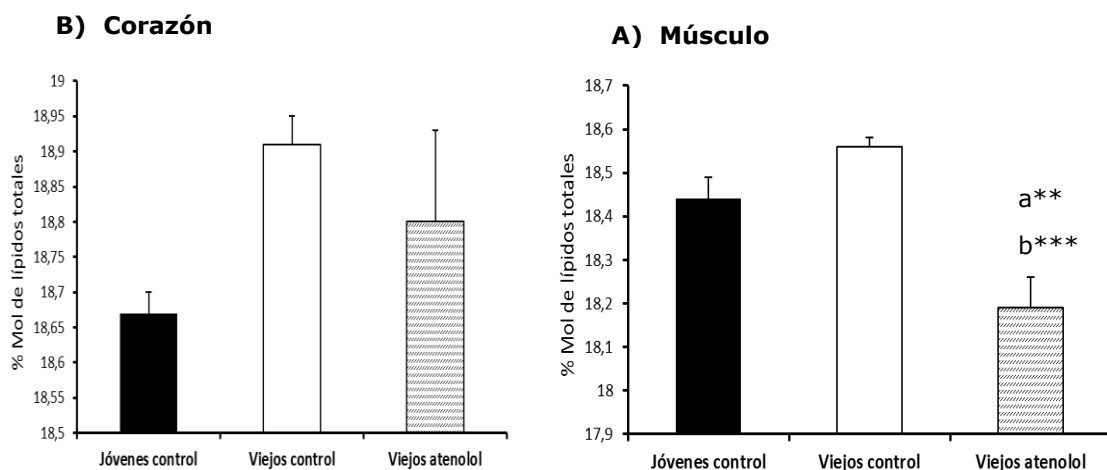
Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.



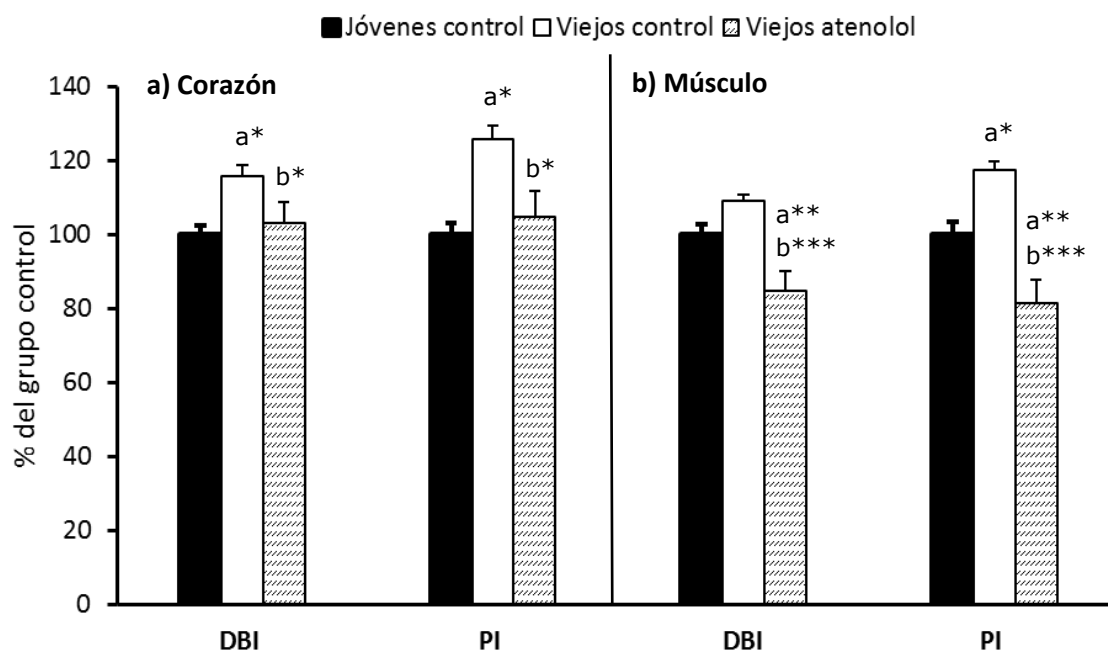
**Figura 41.** Tipos de ácidos grasos en mitocondrias de corazón de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.



**Figura 42.** Tipos de ácidos grasos en mitocondrias de músculo de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.



**Figura 43.** Longitud media de cadena (ACL) en mitocondrias de corazón (A) y músculo (B) de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.



**Figura 44.** Índice de dobles enlaces (DBI) e índice de peroxidizabilidad (PI) de los lípidos de mitocondrias de corazón y músculo de ratón. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \* (p < 0,01), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

**1.2.11. Estimación de las actividades desaturasa y elongasa**

Las actividades desaturasa y elongasa fueron estimadas para ambos órganos. En cuanto a las actividades desaturasa se puede apreciar como en corazón las actividades  $\Delta 9$  disminuyen significativamente en ambos grupos de ratones viejos, mientras que las actividades  $\Delta 8$  y  $\Delta 6$  aumentan en viejos control y ambas vuelven a disminuir tras el tratamiento con atenolol, al contrario que la actividad  $\Delta 5$  que disminuye en los viejos control para aumentar en los viejos tratados (Tabla 19). En músculo esquelético, la actividad  $\Delta 8$  disminuye en viejos atenolol respecto a jóvenes, mientras que la  $\Delta 5$  disminuye en los dos grupos de ratones viejos y la  $\Delta 6$  aumenta en viejos atenolol respecto a los viejos control (Tabla 21).

En cuanto a la actividad elongasa, en corazón se puede apreciar como la actividad ELOVL6 aumenta en los viejos tratados con atenolol comparados con los jóvenes control, y la ELOVL 1/3 aumenta en los viejos control respecto a los jóvenes. La actividad ELOVL 2 (n-3) disminuye significativamente en los viejos control respecto a los jóvenes y aumenta de nuevo tras el tratamiento con el fármaco para alcanzar valores semejantes a los de los jóvenes control. El ratio que nos permite valorar la beta-oxidación peroxisómica aumenta también en los viejos control comparados con los jóvenes y disminuye en los viejos tratados con atenolol con respecto a los viejos control (Tabla 20) En el músculo esquelético tan solo la actividad ELOVL 5 (n-6) se ve modificada significativamente, aumentando en los viejos atenolol con respecto a los jóvenes. El patrón de variación de la beta-oxidación peroxisómica es el mismo que en corazón, aumentando significativamente en los viejos control para revertir tras el tratamiento alcanzando valores similares a los del grupo de los jóvenes (Tabla 22)

Cabe resaltar el descenso significativo que se produce en la beta-oxidación peroxisómica (ratio 22:6/24:6) en los ratones tratados con atenolol con respecto a los viejos control, en los dos órganos estudiados

**Tabla 19.** Estimación de las actividades desaturasa en lípidos de mitocondrias de corazón de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol.

DESATURASAS		Jóvenes control	Viejos control	Viejos atenolol
$\Delta 9$ (n-7)	C16:1/C16:0	0.12±0.02	0.06±0.008 <sup>a*</sup>	0.05±0.002 <sup>a**</sup>
$\Delta 9$ (n-9)	C18:1/C18:0	1.27±0.10	0.69±0.03 <sup>a***</sup>	1.08±0.04 <sup>b***</sup>
$\Delta 8$ (n-6)	C20:3/C20:2	0.68±0.07	2.98±0.61 <sup>a***</sup>	0.63±0.09 <sup>b***</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	C20:4/C20:3	13.31±1.97	2.09±0.33 <sup>a***</sup>	17.74±2.17 <sup>b***</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	C24:6/C24:5	0.50±0.05	1.03±0.23 <sup>a*</sup>	0.55±0.07 <sup>b*</sup>

Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \* (p < 0,05), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 animales.

**Tabla 20.** Estimación de las actividades elongasa en lípidos de mitocondrias de corazón de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol.

ELONGASAS		Jóvenes control	Viejos control	Viejos atenolol
ELOVL 3 (n-9)	C20:1/C18:1	0.03±0.005	0.04±0.007	0.02±0.003
ELOVL 6	C18:0/C16:0	0.78±0.09	0.92±0.04	0.98±0.01 <sup>a*</sup>
ELOVL 1/3	C20:0/C18:0	0.03±0.009	0.01±0.001 <sup>a*</sup>	0.01±0.001
ELOVL 1/3	C22:0/C20:0	0.84±0.16	0.81±0.11	0.71±0.07
ELOVL 1/3	C24:0/C22:0	4.07±1.19	2.77±0.54	3.26±0.51
ELOVL 5 (n-6)	C20:2/C18:2	0.07±0.01	0.10±0.02	0.07±0.02
ELOVL 2/5 (n-6)	C22:4/C20:4	0.09±0.01	0.10±0.01	0.07±0.002
ELOVL 2/5 (n-3)	C22:5/C20:5	5.85±1.49	9.22±1.05	8.94±0.82
ELOVL2 (n-3)	C24:5/C22:5	0.30±0.03	0.11±0.02 <sup>a*</sup>	0.28±0.07 <sup>b*</sup>
Beta-oxidación peroxisómica	C22:6/C24:6	79.80±10.58	187.94±19.46 <sup>a***</sup>	101.71±7.86 <sup>b***</sup>

Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \* (p < 0,05), \*\*\* (p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 animales.

**Tabla 21.** Estimación de las actividades desaturasa en lípidos de mitocondrias de músculo esquelético de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol.

DESATURASAS		Jóvenes control	Viejos control	Viejos atenolol
<b>Δ9 (n-7)</b>	<b>C16:1/C16:0</b>	0.12±0.003	0.12±0.004	0.12±0.016
<b>Δ9 (n-9)</b>	<b>C18:1/C18:0</b>	1.43±0.10	1.17±0.07	1.47±0.22
<b>Δ8 (n-6)</b>	<b>C20:3/C20:2</b>	2.06±0.11	2.48±0.24	1.89±0.08 <sup>b*</sup>
<b>Δ5 (n-6)</b>	<b>C20:4/C20:3</b>	3.07±0.22	2.00±0.30 <sup>a*</sup>	1.74±0.39 <sup>a**</sup>
<b>Δ6 (n-3)</b>	<b>C24:6/C24:5</b>	0.79±0.09	1.04±0.08	1.12±0.11 <sup>a*</sup>

Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,01). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 animales.

**Tabla 22.** Estimación de las actividades elongasa en lípidos de mitocondrias de músculo esquelético de ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol.

ELONGASAS		Jóvenes control	Viejos control	Viejos atenolol
<b>ELOVL 3 (n-9)</b>	<b>C20:1/C18:1</b>	0.02±0.007	0.02±0.002	0.02±0.002
<b>ELOVL 6</b>	<b>C18:0/C16:0</b>	0.62±0.02	0.61±0.04	0.61±0.05
<b>ELOVL 1/3</b>	<b>C20:0/C18:0</b>	0.01±0.002	0.02±0.004	0.02±0.002
<b>ELOVL 1/3</b>	<b>C22:0/C20:0</b>	0.97±0.10	0.80±0.11	0.71±0.12
<b>ELOVL 1/3</b>	<b>C24:0/C22:0</b>	2.85±0.19	3.41±0.67	3.22±0.19
<b>ELOVL 5 (n-6)</b>	<b>C20:2/C18:2</b>	0.05±0.005	0.06±0.01	0.10±0.02 <sup>a*</sup>
<b>ELOVL 2/5 (n-6)</b>	<b>C22:4/C20:4</b>	0.09±0.003	0.14±0.02	0.11±0.003
<b>ELOVL 2/5 (n-3)</b>	<b>C22:5/C20:5</b>	10.23±0.94	8.04±1.04	8.30±0.99
<b>ELOVL2 (n-3)</b>	<b>C24:5/C22:5</b>	0.16±0.03	0.11±0.009	0.12±0.01
<b>Beta-oxidación peroxisómica</b>	<b>C22:6/C24:6</b>	62.95±7.16	103.44±10.32 <sup>a**</sup>	65.45±5.31 <sup>b**</sup>

Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,01). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 animales.



### **1.2.12. Estudios de comportamiento**

Los resultados obtenidos en relación al tratamiento con atenolol sobre los comportamientos de actividad exploratoria y ansiedad de los ratones viejos control y viejos tratados con atenolol se resumen en las tablas 1.2.14 y 1.2.15.

La tabla 23 muestra la actividad de dichos ratones en el campo abierto. Aunque no se llegaron a obtener diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), los ratones tratados con atenolol tardaron menos tiempo en comenzar la prueba que los ratones control, como se indica en el parámetro que mide la latencia al inicio del movimiento. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la deambulación de los animales en ninguna parte del campo abierto ni en el “*grooming*” o acicalamiento de los mismos. Sin embargo, en los ratones tratados con atenolol la frecuencia de postura erguida fue mayor en el centro del campo ( $p < 0,001$ ) y presentaron un menor número de defecaciones ( $p < 0,001$ ).

En la tabla 24 se pueden ver los resultados correspondientes a las pruebas del tablero con agujeros, laberinto en cruz, y reflejo extensor del cuarto trasero. En la prueba del tablero con agujeros, no se observaron diferencias significativas en la deambulación ni en el tiempo de exploración entre los grupos experimentales, si bien los animales tratados con atenolol presentaron menor número de defecaciones ( $p < 0,001$ ) y de micciones ( $p < 0,05$ ) que los animales control.

No se observaron diferencias significativas entre grupos en la prueba del laberinto en T, siendo similar el tiempo que emplearon todos los ratones en cruzar la intersección de los dos brazos.

Además, diferentes pruebas sensomotoras se llevaron a cabo con el fin de evaluar los reflejos, el equilibrio, la coordinación motora, el vigor muscular y la tracción. Los animales viejos tratados con atenolol mostraron un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) en los reflejos extensores del cuarto trasero (Tabla 24). Con respecto al equilibrio, el porcentaje de ratones que se cayeron de la cuerda fue mayor ( $p < 0,001$ ) en los viejos control que en los jóvenes (Figura 45A), disminuyendo en el grupo de animales tratados con atenolol hasta mostrar un equilibrio similar al de ratones jóvenes.

La coordinación motora en la prueba de la barra de madera fue mejor en los viejos tratados con atenolol que en los viejos control (Figuras 45C y D). El porcentaje de

animales que recorrieron al menos un segmento (Figura 45 C) fue el 50% en viejos control y el 100% en viejos tratados con atenolol (incluso mejor que en los ratones jóvenes). El porcentaje de animales que completaron la prueba (Figura 45D) fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el grupo de los viejos tratados que en los viejos control, aunque este porcentaje fue menor ( $p < 0,001$ ) que en los ratones jóvenes.

La prueba de la cuerda tirante muestra claramente una reducción en el vigor muscular (Figura 45 E y F) en los ratones viejos comparados con los jóvenes. Los animales tratados mostraron un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) en el porcentaje de ratones que consiguieron completar al menos un segmento de la cuerda (Figura 45 E) y en completar el test, es decir, en llegar al final de la cuerda (Figura F). El porcentaje de animales que se cayeron de la cuerda (Figura 45B) fue también menor ( $p < 0,05$ ) en los viejos tratados con atenolol que en los viejos control (que se cayeron todos), pero mayor que en el grupo de los jóvenes ( $P < 0,001$ ).

**Tabla 23.** Comportamiento en el campo abierto de ratones viejos control y viejos tratados con atenolol.

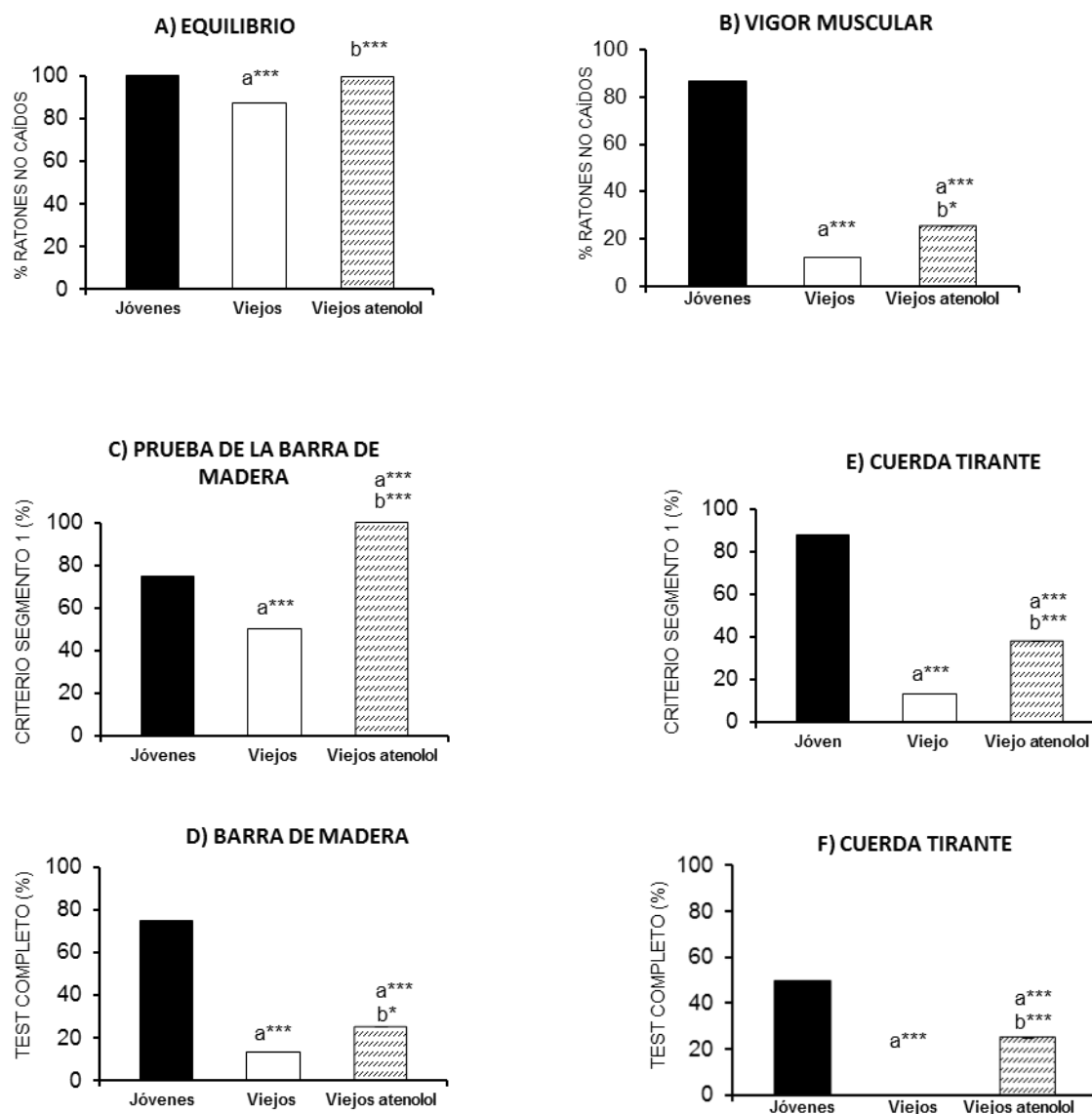
<b>Campo abierto</b>	<b>Viejos control</b>	<b>Viejos atenolol</b>
<b>Latencia al inicio del movimiento (segundos)</b>	9,25±5,8	1,94±0,49
<b>Deambulación externa (DE)</b>	172±31	152±27
<b>Deambulación interna (DI)</b>	69±18	81±11
<b>Ratio DI/DE</b>	24±4	32±5
<b>Postura erguida (nº)</b>	23,5±3	25,5±2
<b>Postura erguida (segundos)</b>	33±3	37±5
<b>% Postura erguida central</b>	75	100b***
<b>Acicalamiento</b>	63	50
<b>Defecación</b>	63	38b***

Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>b</sup>viejos control; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

**Tabla 24.** Comportamiento en el tablero con agujeros, el laberinto en cruz y el reflejo extensor del cuarto trasero de ratones viejos control y viejos tratados con atenolol.

	Viejos Control	Viejos atenolol
<b><u>Tablero con agujeros</u></b>		
<b>Deambulación total</b>	231±35	243±36
<b>Tiempo de exploración</b>	59±13	75±23
<b>% Defecaciones</b>	25	0b***
<b>% Micciones</b>	25	13b*
<b><u>Laberinto en T</u></b>		
<b>Tiempo para cruzar la intersección</b>	5±1,1	4±1,1
<b><u>Reflejo extensor del cuarto trasero</u></b>		
<b>% de ratones que muestran respuesta</b>	63	75b***

Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>b</sup>viejos control; \*(p < 0,05), \*\*\*(p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.



**Figura 45.** Habilidades sensorimotoras de ratones jóvenes control, viejos control y viejos atenolol. El equilibrio (A) y la coordinación motora fueron evaluados con la prueba de la barra de madera (C y D). La coordinación motora se probó también con la prueba de la cuerda tirante (E y F), prueba que también nos permitió evaluar el vigor muscular (B). **Podemos ver como en todos los casos, el atenolol previene cambios comportamentales asociados a la edad.** Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*( $p < 0,05$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

### 1.2.13. Estudios de funciones inmunitarias

Los resultados de la linfoproliferación de leucocitos esplénicos se muestran en la tabla 25. Se obtuvieron datos correspondientes a la linfoproliferación basal, y en respuesta a dos mitógenos: concanavalina A y lipopolisacárido, ambas expresadas en cpm (cuentas por minuto) o en porcentaje. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en ninguno de los casos.

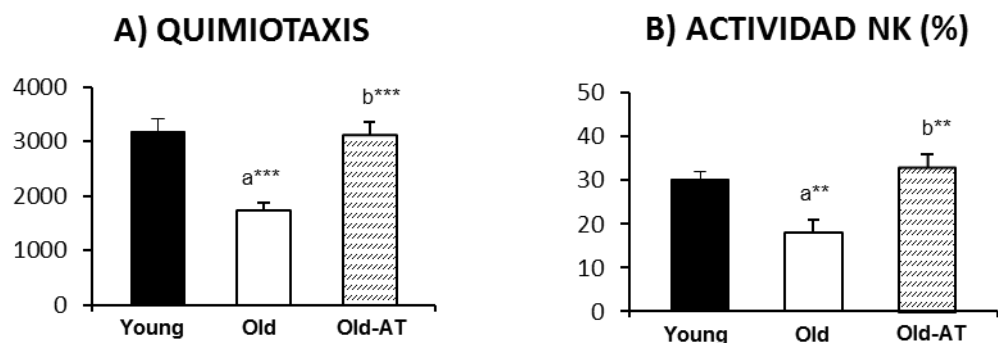
La migración de los leucocitos de bazo aparece representada en la figura 46A como el índice de quimiotaxis. Esta actividad se ve disminuida en los ratones viejos debido a efectos de la edad ( $p < 0,001$ ) para recuperarse gracias al tratamiento con atenolol (en ratones viejos tratados con el fármaco) hasta alcanzar valores semejantes a los de ratones jóvenes.

Lo mismo sucedió con la actividad “natural killer” de los leucocitos de bazo (Figura 46B), que disminuyó ( $p < 0,01$ ) en los ratones viejos control con respecto a los animales jóvenes, para recuperar los mismos niveles que los jóvenes gracias al tratamiento de los ratones viejos con atenolol.

**Tabla 25.** Proliferación (cuentas por minuto) de linfocitos murinos esplénicos no estimulados (basal) y estimulados con concanavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS).

<u>Linfoproliferación</u>	Jóvenes Control	Viejos control	Viejos atenolol
<b><u>Basal</u></b>			
cpm	1887±127	2266±408	3152±534
<b><u>ConA</u></b>			
cpm	11831±2898	12754±1881	14253±2072
% de estimulación	752±146	721±94	720±184
<b><u>LPS</u></b>			
cpm	6925±1422	6674±413	7215±1184
% de estimulación	373±64	223±36	319±30

Cpm= cuentas por minuto. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.



**Figura 46.** Parámetros de la función inmune: quimiotaxis (A) y actividad natural killer (B). Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>jóvenes control, <sup>b</sup>viejos control; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

#### 1.2.14. Presión sanguínea y frecuencia cardíaca a edades avanzadas

En la tabla 26 se recogen las medidas de frecuencia cardíaca y presión sanguínea sistólica, diastólica y media de los dos grupos de ratones viejos a los 35 meses de edad. En esta edad avanzada, los cuatro parámetros medidos fueron significativamente más bajos en los ratones viejos tratados con atenolol en comparación con los ratones control.

**Tabla 26.** Frecuencia cardíaca y presión sanguínea en ratones jóvenes control, viejos control y viejos tratados con atenolol, a los 35 meses de edad.

	Viejos control	Viejos atenolol
<b>Frecuencia cardíaca (Pulsaciones/min)</b>	655.2 $\pm$ 7.3	521.9 $\pm$ 19.0 <sup>b***</sup>
<b>Presión arterial sistólica</b>	249.8 $\pm$ 6.0	229.7 $\pm$ 9.3 <sup>b*</sup>
<b>Presión arterial media</b>	213.4 $\pm$ 7.7	190.6 $\pm$ 9.6 <sup>b*</sup>
<b>Presión arterial diastólica</b>	196.7 $\pm$ 8.7	171.6 $\pm$ 10.3 <sup>b*</sup>

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 10 animales. Los animales tenían 35 meses de edad cuando se tomaron las medidas. Las unidades de presión sanguínea: mm de Hg. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>b</sup>viejos control; \*( $p < 0,05$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ).

### 1.2.15. Estudios de longevidad: curvas de supervivencia

Estos estudios se llevaron a cabo en animales separados desde el principio de los ratones utilizados para las demás medidas de este estudio. Las curvas de longevidad completas se muestran en la Figura 47. No se detectaron diferencias significativas en la longevidad media, mediana o máxima (supervivencia del 90%), como se aprecia en la Tabla 27, ni en la longevidad total (Tabla 28) con ninguna de las dos pruebas realizadas (Log Rank y Wilcoxon) comparando animales control con animales tratados con atenolol durante toda su vida. Solamente un animal del grupo control permaneció vivo hasta los 3,93 años (1.433 días) mientras que el más longevo de los animales del grupo atenolol vivió 3,6 años (1.310 días) (Tabla 27).

Sin embargo, se registró una mortalidad significativamente mayor tanto con la prueba de Log Rank como con Wilcoxon ( $p < 0,01$ ) en el grupo de los animales tratados con atenolol en el período de edad comprendido entre los 1.000 y los 1.275 días de edad (Tabla 28).

**Tabla 27.** Longevidad media, mediana y máxima en ratones control y tratados durante toda su vida con atenolol.

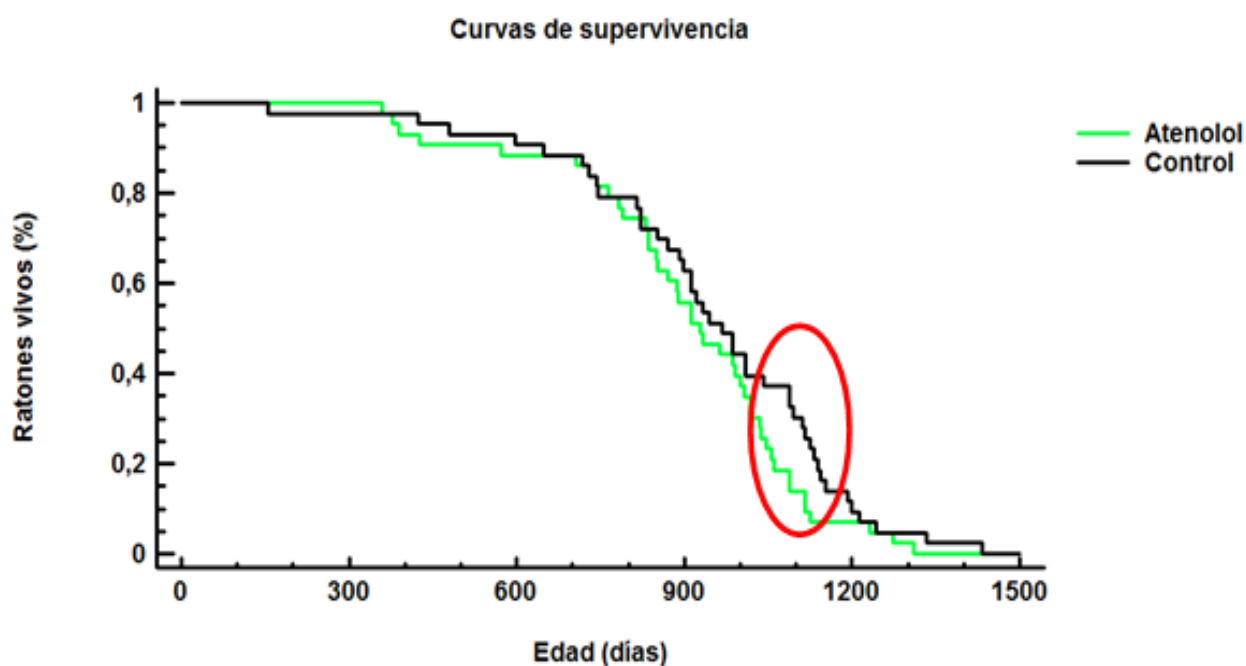
	Control	Atenolol	Prueba logRank (P<)	Prueba Wilcoxon
<b>Longevidad media a*</b>	944±37	901±34	0.74	0.73
<b>Longevidad mediana</b>	967	928	0.73	0.68
<b>Longevidad máxima (90%) b*</b>	1.140	1.116	0.16	0.30
<b>Longevidad máxima</b>	1.433	1.310		

Las longevidades están expresadas en días ( $\pm$  SEM en el caso de la longevidad media). Corresponden a los 86 animales (43 controles y 43 tratados con atenolol) que formaron parte del estudio de supervivencia y se corresponden con las curvas de supervivencia (Figura 1.2.13). a\*: pruebas estadísticas Log Rank y Wilcoxon para la supervivencia media, del 50%, hasta los 716 días de edad. La prueba t-student para la longevidad media tampoco fue significativa ( $p < 0,19$ ); b\*: la longevidad máxima del 90%, que corresponde con la “edad que tenían los animales cuando el 90% de los animales del grupo había muerto”, fue registrada y analizada con la prueba Log Rank ( $p < 0,21$ ) y Wilcoxon ( $p < 0,30$ ).

**Tabla 28.** Análisis estadístico de las curvas de supervivencia totales y parciales en ratones control y tratados durante toda su vida con atenolol.

	Chi cuadrado	P<
<b><u>Curva total:</u></b>		
<b>Prueba Log Rank</b>	1,94	0,16
<b>Prueba Wilcoxon</b>	1,10	0,29
<b><u>Supervivencia entre 1.000-1.175 días:</u></b>		
<b>Prueba Log Rank</b>	7,45	0.0063 <sup>b**</sup>
<b>Prueba Wilcoxon</b>	6,70	0.0096 <sup>b**</sup>

b\* = diferencias significativas en la longevidad entre ratones control y ratones tratados con atenolol durante toda su vida.



**Figura 47.** Curvas de supervivencia (gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier) durante toda la vida de ratones control y tratados crónicamente con atenolol. No se observaron diferencias significativas entre los grupos salvo en el tramo desde los 1.000 a los 1.275 días, señalado con un aro rojo (ver tabla 1.2.12), que correspondería con el periodo de tiempo en el que se detectaron diferencias significativas en la tensión sanguínea y la frecuencia cardíaca (tabla 1.2.17). El ratón control más longevo vivió 1433 días. En este estudio de supervivencia se utilizaron 43 animales por grupo.

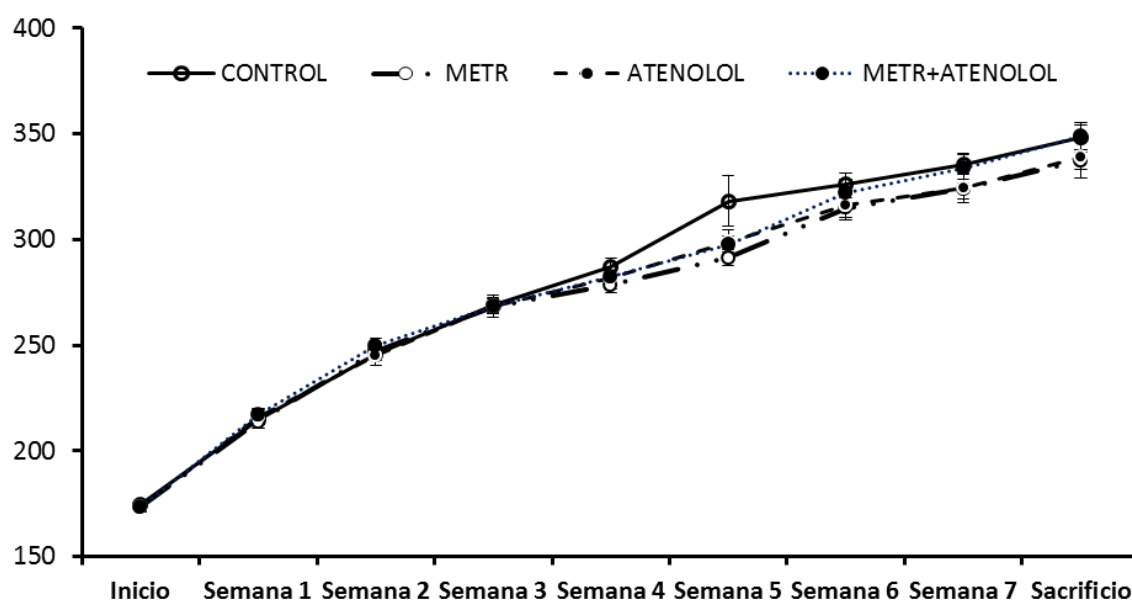


## 2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA Y EL TRATAMIENTO A MEDIO PLAZO CON ATENOLOL EN RATA WISTAR

### 2.1. Peso de animales y órganos

El peso de los animales se controló durante todo el periodo experimental. En ningún momento se detectaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales. (Figura 48).

En la tabla 29 se muestran los pesos de los diferentes órganos. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los cuatro grupos en ningún órgano, excepto en el caso de corazón, cuyo peso fue significativamente superior ( $p < 0,01$ ) en los dos grupos de animales a los que se les administró atenolol en el agua de bebida (AT y MetR+AT) con respecto tanto a los animales control como a los restringidos en metionina en la dieta (MetR).



**Figura 48.** Variación del peso corporal (g) durante el periodo experimental de los animales control, MetR, AT y MetR+AT. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.

**Tabla 29.** Peso de los órganos (g) de las ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con la interacción de ambos tratamientos (MetR+AT).

	Control	MetR	AT	MetR+AT
<b>Hígado</b>	10,04 ± 0,37	9,76 ± 0,45	9,85 ± 0,35	9,35 ± 0,28
<b>Corazón</b>	0,76 ± 0,02	0,77 ± 0,03	0,86 ± 0,02 <sup>a**</sup> , <sup>b**</sup>	0,89 ± 0,03 <sup>a**</sup> , <sup>b*</sup>
<b>Bazo</b>	0,58 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,62 ± 0,05	0,62 ± 0,05
<b>Riñón</b>	1,87 ± 0,06	1,88 ± 0,07	1,87 ± 0,04	1,78 ± 0,06
<b>Cerebro</b>	1,80 ± 0,10	1,87 ± 0,04	1,83 ± 0,05	1,84 ± 0,03

Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>MetR; \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,01).

## **2.2. Consumo de oxígeno mitocondrial**

Las medidas de consumo de oxígeno se realizaron en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP en mitocondrias de hígado aisladas a partir de ratas controles, sometidas a restricción de metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y ratas con dieta restringida en metionina y tratamiento con atenolol simultáneamente (MetR+AT).

En todos los casos la adición de ADP estimuló el consumo de oxígeno mitocondrial, indicando el buen estado de las mitocondrias aisladas. Al comparar la intensidad del consumo de oxígeno entre los diferentes grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas (p > 0,05) entre ninguno de ellos (Tabla 30)

Tampoco se apreciaron diferencias significativas en los índices de control respiratorio (RCI) entre los grupos experimentales con ninguno de los sustratos empleados, si bien el RCI fue mayor utilizando glutamato-malato como sustrato (Tabla 31).

**Tabla 30.** Tasa de consumo de oxígeno (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot) en mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con la interacción de ambos tratamientos (MetR+AT) utilizando como sustratos glutamato-malato y succinato+rotenona en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP.

Sustrato	Control	MetR	AT	MetR+AT
<b>Glutamato-malato (Estado 4)</b>	15,2 ± 1,8	15,7 ± 1,6	13 ± 0,8	14,9 ± 1
<b>Glutamato-malato (Estado 3)</b>	140,2 ± 14,1	142,8 ± 12,4	131,2 ± 7,1	137,5 ± 7,8
<b>Succinato + rotenona (Estado 4)</b>	40,6 ± 2	40,3 ± 1,7	39,1 ± 2,6	40,5 ± 2
<b>Succinato + rotenona (Estado 3)</b>	160,9 ± 11,1	154 ± 8,7	153,9 ± 10,8	154,9 ± 10

Los resultados se expresan en nanomoles de O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

**Tabla 31.** Índice de control respiratorio (RCR) en mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT) utilizando como sustratos glutamato-malato y succinato+rotenona. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Sustrato	Control	RMet	AT	RMet+AT
<b>Glutamato-malato</b>	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,6	10,4 ± 0,8	9,4 ± 0,8
<b>Succinato + rotenona</b>	4 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,8 ± 0,1

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

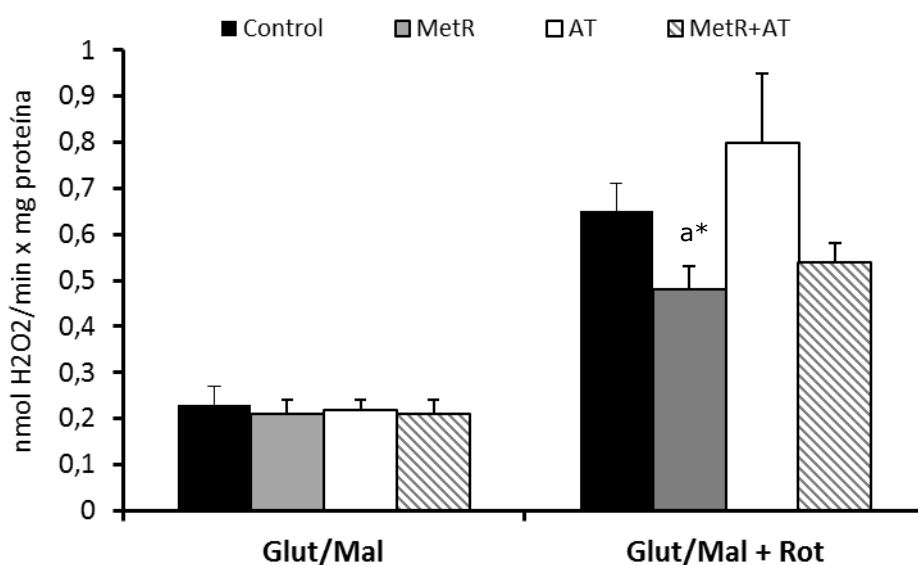
### **2.3. Producción mitocondrial de radicales libres**

Las pruebas de producción de ROS se hicieron en presencia de sustratos del complejo I (glutamato/malato) y del complejo II (succinato) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Se utilizó rotenona (inhibidor del complejo I) con el sustrato del complejo I para estudiar la producción máxima de radicales libres por parte de dicho complejo, y con succinato para medir la tasa de producción basal de ROS del complejo III. La rotenona se utilizó también en combinación con antimicina A (AA; inhibidor del complejo III) con el sustrato del complejo II para estudiar la

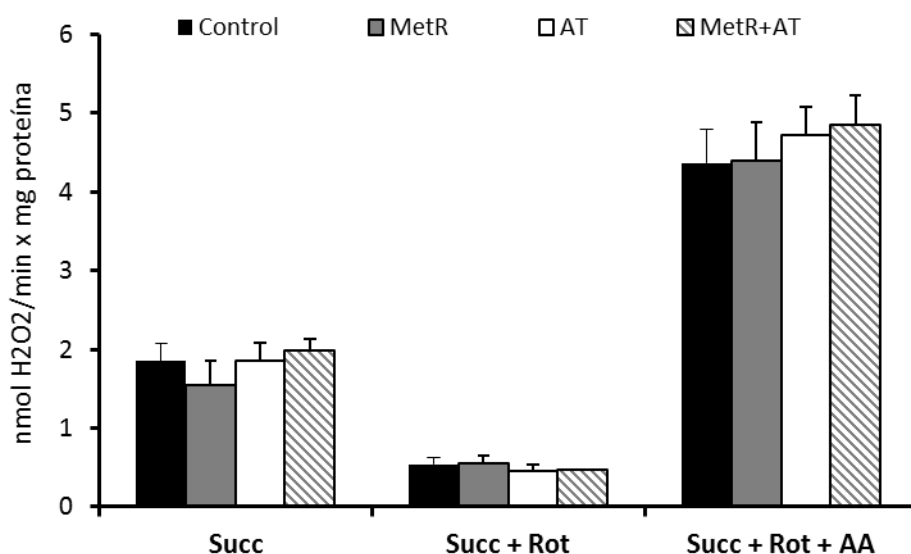
producción máxima de radicales libres por parte del complejo III. Todas las medidas de producción mitocondrial de radicales libres se realizaron en ausencia de ADP (estado 4).

En nuestro estudio se observó un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en la producción máxima de ROS por parte del complejo I (Figura 49) en los animales del grupo restringido en metionina respecto a los animales control. Sin embargo, no se llegaron a detectar diferencias significativas entre el grupo con la combinación de ambos tratamientos (MetR + AT) y los demás, aunque si una tendencia a presentar una menor producción de ROS con Glutamato + rotenona comparado con el grupo AT y se encuentra cerca de la significación cuando se compara con el grupo Control ( $p = 0,052$ ).

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la producción de basal de ROS del complejo I con glutamato como sustrato (Figura 49), ni en ningún caso en la producción de ROS por parte del complejo III (Figura 50).



**Figura 49.** Tasa de producción de  $H_2O_2$  (nanomoles de  $H_2O_2$  / min  $\times$  mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT) con glutamato-malato como sustrato. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control; \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.



**Figura 50.** Tasas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado de ratas controles, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT) con succinato como sustrato en presencia de los inhibidores rotenona y antimicina. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales diferentes.

#### 2.4. Fuga de radicales libres

Ni la restricción de metionina en la dieta, ni el tratamiento con atenolol, ni la combinación entre ambos dio lugar a diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la fuga de radicales libres de la cadena respiratoria en hígado de rata (Tabla 32).

**Tabla 32.** Fuga de radicales libres (%) en mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT), en presencia de glutamato-malato o succinato (y rotenona) como sustratos.

Sustrato	Control	RMet	AT	RMet+AT
<b>Glutamato-malato</b>	0,82 ± 0,14	0,67 ± 0,09	0,88 ± 0,13	0,72 ± 0,13
<b>Succinato + rotenona</b>	0,69 ± 0,5	0,73 ± 0,16	0,60 ± 0,10	0,59 ± 0,05

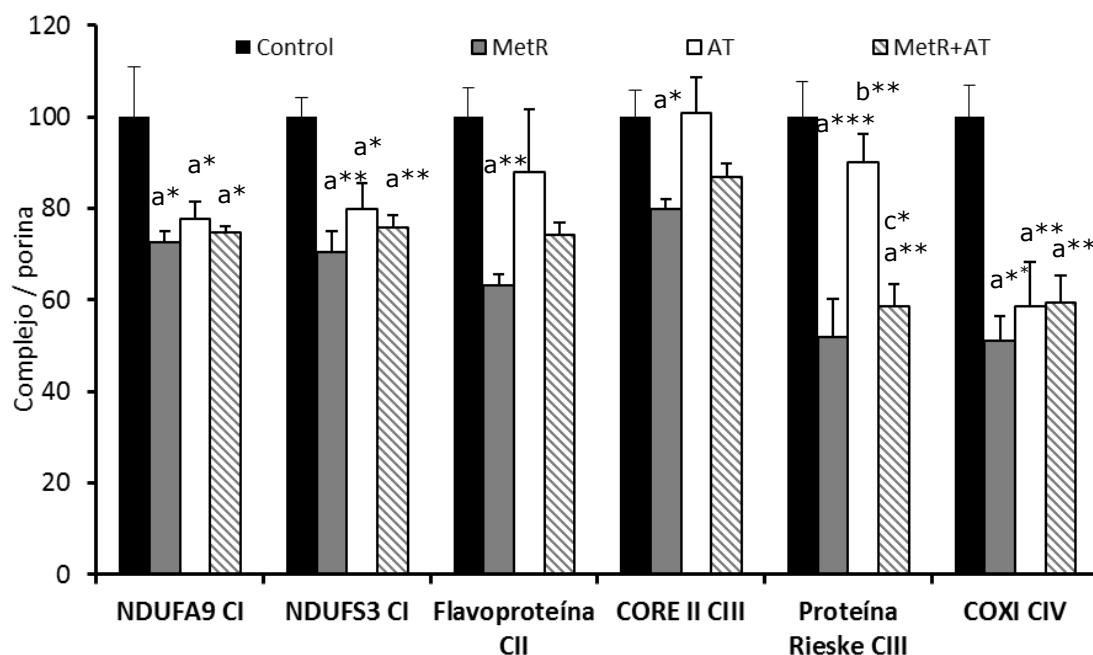
No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales.

### **2.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

La cantidad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se muestran en la figura 51.

Se observó un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de las dos subunidades del complejo I (NDUFA9 y NDUF53) en los tres grupos manipulados experimentalmente con respecto al grupo control. El mismo patrón se repite para la subunidad COX1 del complejo IV, en el que tanto la restricción de metionina, como el tratamiento con atenolol, como la combinación de ambos consiguieron disminuir de forma significativa ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ) la cantidad de dicha subunidad.

En el caso del complejo II, las dos subunidades cuantificadas mostraron un descenso significativo ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ ) solamente en los animales con dieta restringida en metionina. El descenso en la proteína Rieske del complejo III se vio influenciado únicamente por la dieta, ya que disminuyó significativamente en los animales restringidos en metionina con respecto a las ratas control y tratadas con atenolol, y lo mismo ocurrió con los animales que fueron sometidos a ambos tratamientos.

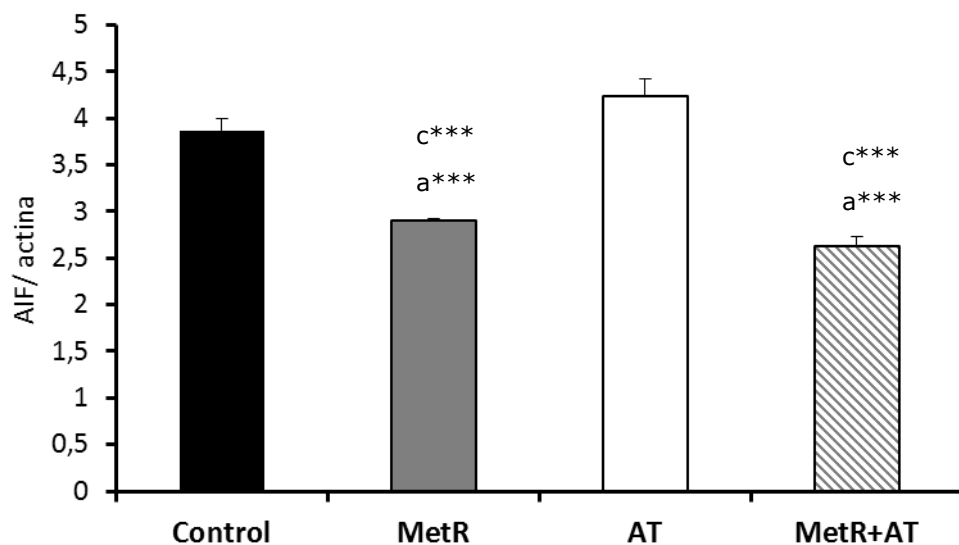


**Figura 50.** Cantidad de los complejos I (sub 39KDa, NDUFA9 y sub 30KDa, NDUF53), II (sub 70KDa, Flavoproteína), III (sub 48KDa, CORE II y sub 29,6 KDa, Centro hierro-sulfurado o proteína Rieske), y IV (sub 57KDa, COXI) de la cadena respiratoria, medida como el cociente de unidades del complejo / unidades de porina, en mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT). Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>MetR, <sup>c</sup>Atenolol; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles} / \text{mol lisina}$  como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

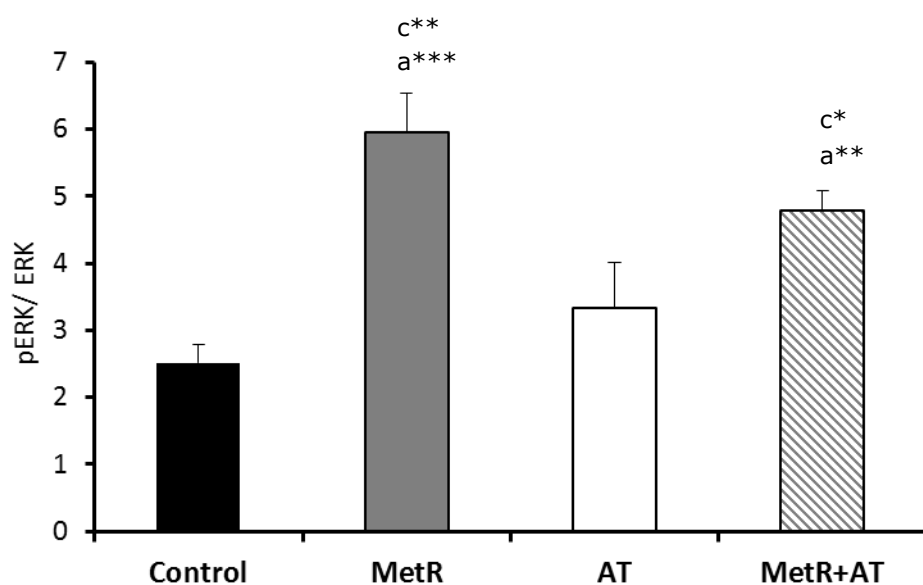
## 2.6. Cantidad de AIF y pERK/ ERK

La cantidad del factor inductor de apoptosis (AIF) estimada como el cociente entre los moles de AIF y los de actina, descendió significativamente ( $p < 0,001$ ) en los dos grupos de animales con dieta restringida en metionina (MetR y MetR+AT) con respecto a los animales control y tratados con atenolol (Figura 51).

El ratio pERK/ ERK aumentó significativamente en los dos grupos de animales con dieta restringida en metionina con respecto a los animales control y tratados con atenolol (Figura 52).



**Figura 51.** Cantidad de AIF (mol de AIF / mol actina) en hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT). Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>Control, <sup>c</sup>Atenolol; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales.



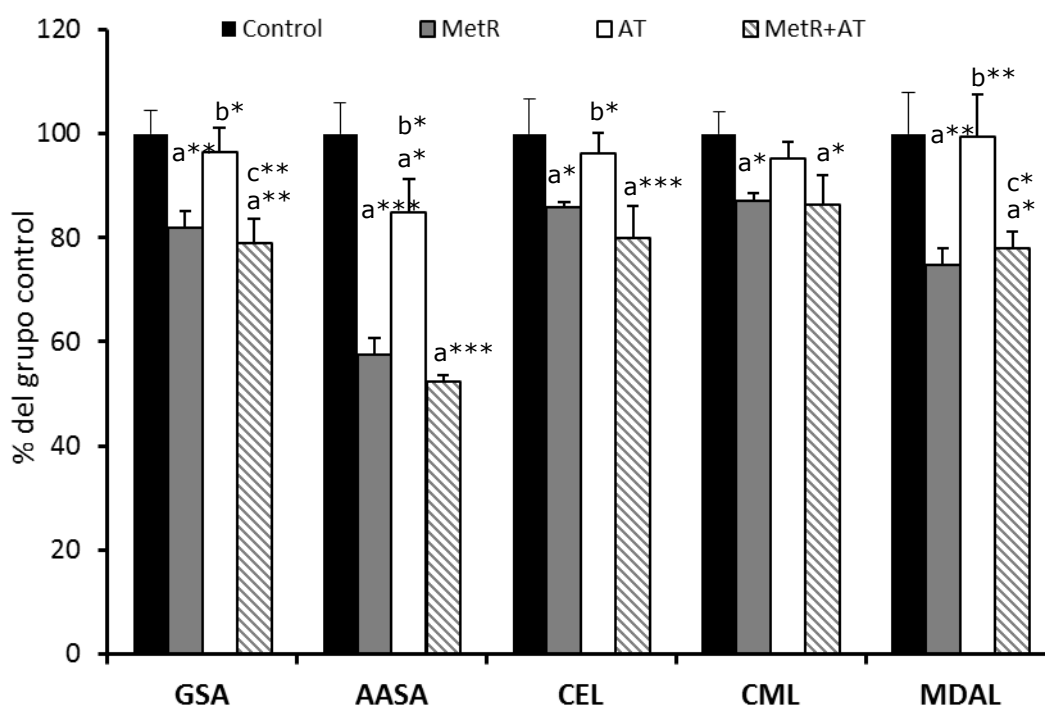
**Figura 52.** Cantidad de proteína MAPK (ratio pERK/ ERK) en hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT). Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>c</sup>Atenolol; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales.



## 2.7. Daño oxidativo a proteínas

En la figura 53 se representan los distintos marcadores de daño oxidativo a proteínas: oxidación (GSA y AASA), glicooxidación (CEL y CML) y lipooxidación (MDAL) medidos en las proteínas mitocondriales de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos combinados (MetR+AT).

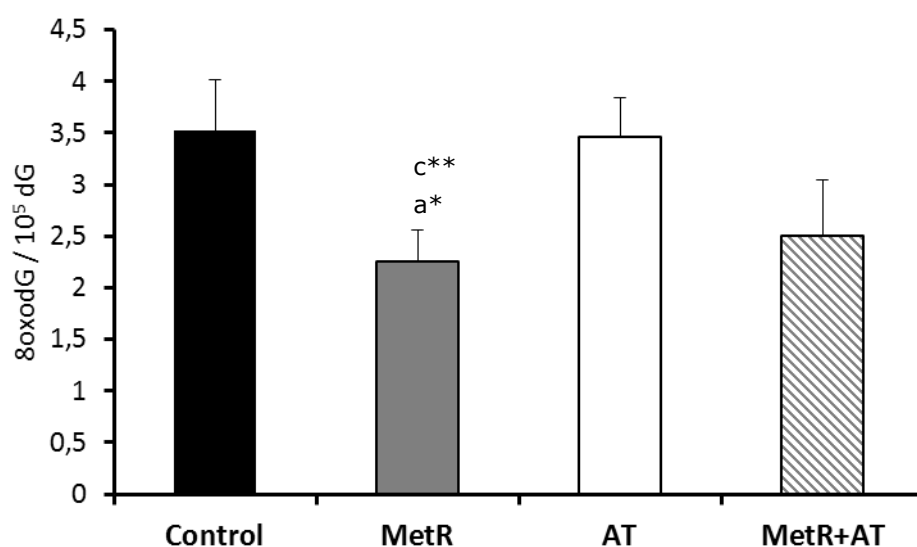
En todos los marcadores se produjo un descenso significativo en los animales restringidos en metionina (tanto MetR con MetR+AT) con respecto al grupo control, y en todos los MetR menos en el caso del CML también respecto al grupo atenolol. En el grupo MetR+AT solamente los marcadores GSA y MDAL descendieron significativamente con respecto al grupo atenolol.



**Figura 53.** Marcadores de estrés oxidativo, glicooxidativo y lipooxidativo en proteínas mitocondriales de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT). Valores del grupo de ratas control:  $6255 \pm 276$  (GSA),  $203 \pm 12$  (AASA),  $436 \pm 29$  (CEL),  $1436 \pm 59$  (CML) y  $356 \pm 28$  (MDAL). Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>MetR, <sup>c</sup>Atenolol; \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles} / \text{mol lisina}$  como la media  $\pm$  SEM de 8 animales.

### 2.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial

El daño al ADN mitocondrial se observa en la figura 54. Solamente la dieta MetR fue capaz de disminuir significativamente este parámetro con respecto a los animales control ( $p < 0,05$ ) y los animales tratados con atenolol ( $p < 0,01$ ). Ni el tratamiento con atenolol ni la combinación de las dos manipulaciones experimentales dieron lugar a cambios significativos en este marcador.



**Figura 54.** Daño oxidativo al ADN mitocondrial (8-oxodG / 10<sup>5</sup> dG) en hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con ambos tratamientos (MetR + AT). Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control y <sup>c</sup>Atenolol; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Los valores representan la media ± SEM de 8 animales.

### 2.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales

En la tabla 33 se muestra la composición lipídica de mitocondrias de hígado de rata de los cuatro grupos experimentales de este estudio. El ácido graso 14:0 aumentó significativamente en los grupos MetR y atenolol comparados con el grupo control, al igual que el  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3) que además también aumentó en el grupo MetR+AT. Al contrario, el ácido esteárico (18:0) disminuyó en los animales con restricción de metionina en la dieta en relación a los animales control y el araquídico (20:0) aumentó en los animales tratados con atenolol comparados con los tres grupos.

El ácido graso 20:1n-9 aumentó significativamente en los dos grupos de animales a los que se les suministró atenolol en el agua de bebida (AT y MetR+AT) con respecto al grupo control y el eicosadienoico (20:2n-6) aumentó en los dos grupos restringidos en metionina en la dieta (MetR y MetR+AT) comparados con el grupo control. El ácido graso dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3n-6) solamente aumentó significativamente en el grupo MetR+AT respecto al grupo control, mientras que los ácidos grasos adrenico (22:4n-6) y docosapentaenoico (22:5n-6) disminuyeron en el grupo MetR+AT comparados con el MetR, y el último descendió también en el grupo MetR+AT al compararlo con el grupo control.

En cuanto a los tipos de ácidos grasos calculados (Tabla 34), solo se detectaron diferencias significativas en los ácidos grasos saturados (SFA) que disminuyeron en los dos grupos de animales restringidos en metionina (MetR y MetR+AT) con respecto al grupo control, al contrario que en el caso de los ácidos grasos insaturados (UFA) que aumentaron significativamente en estos dos grupos comparados con el grupo control. Por su parte los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (PUFAn-3) aumentaron significativamente en el grupo MetR con respecto al grupo control. No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en el resto de fracciones estudiadas ni en los índices DBI y PI.

**Tabla 33.** Composición (% mol) de los ácidos grasos de las mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con la interacción de ambos tratamientos (MetR+AT).

	Control	MetR	AT	MetR+AT
<b>14:0</b>	0.49±0.01	1.01±0.02 <sup>a*</sup>	1.22±0.37 <sup>a*</sup>	1.01±0.06
<b>16:0</b>	17.88±0.17	17.62±0.27	17.46±0.32	17.43±0.27
<b>16:1n-7</b>	1.15±0.08	1.32±0.09	1.24±0.12	1.38±0.14
<b>18:0</b>	19.63±0.47	18.18±0.25 <sup>a*</sup>	18.73±0.44	18.46±0.34
<b>18:1n-9</b>	11.35±0.25	11.42±0.19	11.82±0.31	11.59±0.23
<b>18:2n-6</b>	15.49±0.51	16.08±0.36	15.54±0.57	16.39±0.32
<b>18:3n-3</b>	0.13±0.008	0.17±0.009 <sup>a*</sup>	0.18±0.01 <sup>a**</sup>	0.18±0.01 <sup>a**</sup>
<b>18:4n-3</b>	0.08±0.007	0.09±0.005	0.12±0.01 <sup>a*</sup>	0.10±0.01 <sup>b**</sup>
<b>20:0</b>	0.19±0.03	0.17±0.009 <sup>c**</sup>	0.26±0.01 <sup>a*</sup>	0.16±0.01 <sup>c**</sup>
<b>20:1n-9</b>	0.23±0.008	0.27±0.008	0.28±0.02 <sup>a*</sup>	0.31±0.02 <sup>a**</sup>
<b>20:2n-6</b>	0.51±0.01	0.59±0.03 <sup>a*</sup>	0.56±0.01	0.60±0.02 <sup>a*</sup>
<b>20:3n-6</b>	0.61±0.02	0.71±0.02	0.71±0.05	0.79±0.05 <sup>a**</sup>
<b>20:4n-6</b>	25.39±0.32	25.15±0.19	25.22±0.35	25.36±0.22
<b>20:5n-3</b>	0.12±0.02	0.10±0.006	0.14±0.02	0.11±0.007
<b>22:0</b>	0.19±0.03	0.15±0.006	0.18±0.01	0.16±0.01
<b>22:4n-6</b>	0.58±0.03	0.61±0.03	0.57±0.02	0.50±0.02 <sup>b*</sup>
<b>22:5n-6</b>	2.07±0.16	2.16±0.15	1.85±0.17	1.49±0.11 <sup>a*, b**</sup>
<b>22:5n-3</b>	0.41±0.02	0.44±0.02	0.43±0.02	0.42±0.02
<b>24:0</b>	0.13±0.05	0.10±0.006	0.11±0.02	0.09±0.007
<b>22:6n-3</b>	3.11±0.12	3.39±0.14	3.13±0.10	3.25±0.12
<b>24:4n-3</b>	0.08±0.008	0.12±0.03	0.09±0.005	0.09±0.006
<b>24:6n-3</b>	0.03±0.004	0.03±0.002	0.03±0.002	0.03±0.002

Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> control, <sup>b</sup> RMet, <sup>c</sup> Atenolol; \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01).

**Tabla 34.** Tipos de ácidos grasos en mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con la interacción de ambos tratamientos (MetR+AT).

	Control	MetR	AT	MetR+AT
<b>ACL</b>	18.41±0.004	18.40±0.01	18.38±0.02	18.37±0.01
<b>SFA</b>	38.54±0.48	37.25±0.35 <sup>a*</sup>	37.99±0.44	37.33±0.30 <sup>a*</sup>
<b>UFA</b>	61.45±0.48	62.74±0.35 <sup>a*</sup>	62.00±0.44	62.66±0.30 <sup>a*</sup>
<b>MUFA</b>	12.74±0.27	13.02±0.22	13.36±0.31	13.29±0.30
<b>PUFA</b>	48.71±0.49	49.71±0.39	48.64±0.37	49.36±0.30
<b>PUFAn-3</b>	4.01±0.12	4.38±0.16 <sup>a*</sup>	4.15±0.08	4.21±0.11
<b>PUFAn-6</b>	44.69±0.49	45.33±0.40	44.48±0.37	45.15±0.32
<b>DBI</b>	183.80±1.42	187.36±0.98	183.68±1.52	184.50±1.08
<b>PI</b>	163.62±1.53	166.81±1.12	162.52±2.29	162.28±1.50

Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> control; \* (p < 0,05).

### **2.10. Estimación de las actividades desaturasa y elongasa**

Las actividades desaturasa se muestran en la Tabla 35 La actividad Δ8 disminuyó significativamente en los dos grupos experimentales con una dieta restringida en metionina (MetR y MetR+AT) con respecto tanto al grupo control como al grupo de animales tratados con atenolol. La actividad Δ5 tan solo disminuyó significativamente en los animales del grupo MetR+AT con respecto a los del grupo control. No se detectaron diferencias significativas en el resto de actividades desaturasa.

La tabla 36 recoge las actividades elongasa en lípidos de mitocondrias de hígado de los cuatro grupos estudiados. La actividad Elovl3(n-9) aumentó ligeramente en los animales del grupo RMet+AT con respecto al grupo control, mientras que las actividades Elovl1/3 (20:0/18:0) y (22:0/20:0) aumentaron significativamente en el grupo atenolol comparado con los otros tres. La actividad elongasa Elovl2 2/5 (n-6)

disminuyó significativamente en el grupo RMet+AT con respecto a los grupos control y RMet.

**Tabla 35.** Estimación de las actividades desaturasa en lípidos de mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con la interacción de ambos tratamientos (MetR+AT).

DESATURASAS		Control	RMet	AT	RMet+AT
$\Delta 9$ (n-7)	C16:1/C16:0	0.06±0.004	0.07±0.004	0.07±0.005	0.07±0.008
$\Delta 9$ (n-9)	C18:1/C18:0	0.58±0.02	0.62±0.01	0.63±0.02	0.63±0.02
$\Delta 8$ (n-6)	C20:3/C20:2	2.26±0.11	1.23±0.09 <sup>a***, c**</sup>	1.86±0.17	1.32±0.11 <sup>a***, c**</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	C20:4/C20:3	41.57±1.67	35.39±1.50	36.66±2.61	33.33±2.64 <sup>a*</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	C24:6/C24:5	0.42±0.02	0.38±0.04	0.36±0.01	0.38±0.03
$\Delta 6$ (n-6)	C18:4/C18:3	0.61±0.05	0.58±0.01	0.64±0.03	0.57±0.03

Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>c</sup>AT; \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001).

**Tabla 36.** Estimación de las actividades elongasa en lípidos de mitocondrias de hígado de ratas control, restringidas en metionina (MetR), tratadas con atenolol (AT) y con la interacción de ambos tratamientos (MetR+AT).

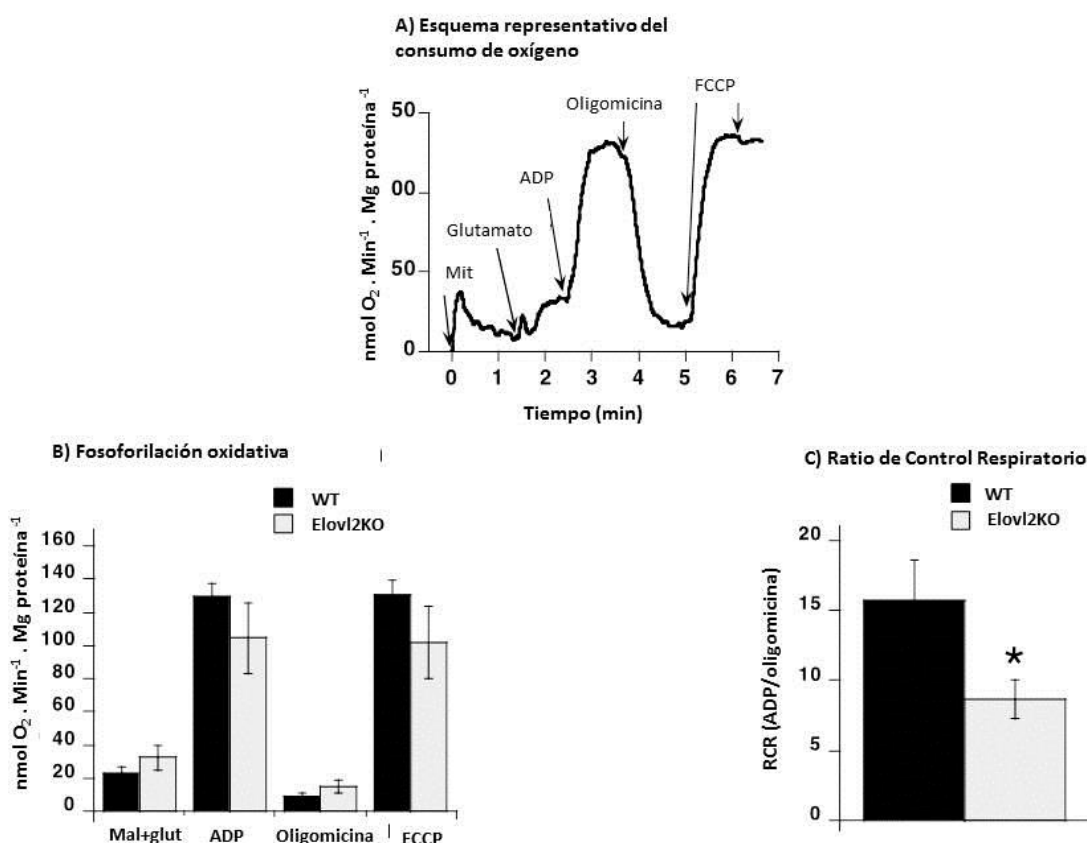
ELONGASAS		Control	RMet	AT	RMet+AT
ELOVL 3 (n-9)	C20:1/C18:1	0.02±0.001	0.02±0.001	0.02±0.001	0.02±0.002 <sup>a***</sup>
ELOVL 6	C18:0/C16:0	1.09±0.03	1.03±0.02	1.07±0.03	1.06±0.03
ELOVL 1/3	C20:0/C18:0	0.01±0.001	0.009±0.0004	0.01±0.0009 <sup>a**, b**</sup>	0.009±0.0007 <sup>c***</sup>
ELOVL 1/3	C22:0/C20:0	0.96±0.05	0.91±0.02	0.72±0.02 <sup>a***, b***</sup>	0.98±0.03 <sup>c***</sup>
ELOVL 1/3	C24:0/C22:0	0.61±0.10	0.64±0.03	0.57±0.07	0.59±0.06
ELOVL 5 (n-6)	C20:2/C18:2	0.03±0.0008	0.03±0.001	0.03±0.0005	0.03±0.001
ELOVL 2/5 (n-6)	C22:4/C20:4	0.02±0.001	0.02±0.001	0.02±0.0009	0.01±0.0008 <sup>a*, b*</sup>
ELOVL 2/5 (n-3)	C22:5/C20:5	4.22±0.70	4.40±0.26	3.40±0.31	3.71±0.32
ELOVL2 (n-3)	C24:5/C22:5	0.21±0.02	0.30±0.11	0.22±0.02	0.23±0.02
Beta-oxidación peroxisómica	C22:6/C24:6	95.26±14.09	89.22±4.81	90.58±5.65	92.28±6.74

Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>RMet, <sup>c</sup>AT; \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001).

### 3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATONES ELOVL2 KO

#### 3.1. Estudio de la función mitocondrial

Se estudió la función mitocondrial en mitocondrias de hígado aisladas de ratones silvestres de la cepa 129Sv (WT) y de ratones con ausencia del gen que codifica para la elongasa 2 (Elovl2KO, del inglés “Knocked out”). Para poder evaluar esta función, tras aislar las mitocondrias de hígado se midió la tasa de fosforilación oxidativa (Figura 55B) en mitocondrias procedentes de animales de ambos grupos experimentales, de acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 55A. En este análisis, solamente se vieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el índice de control respiratorio (RCR) obtenido con los valores de consumo de oxígeno medido en presencia de ADP y de oligomicina (ratio ADP/oligomicina) (Figura 55C) de los ratones ELOVL2KO, que descendió un 54,7% en comparación con los ratones WT.



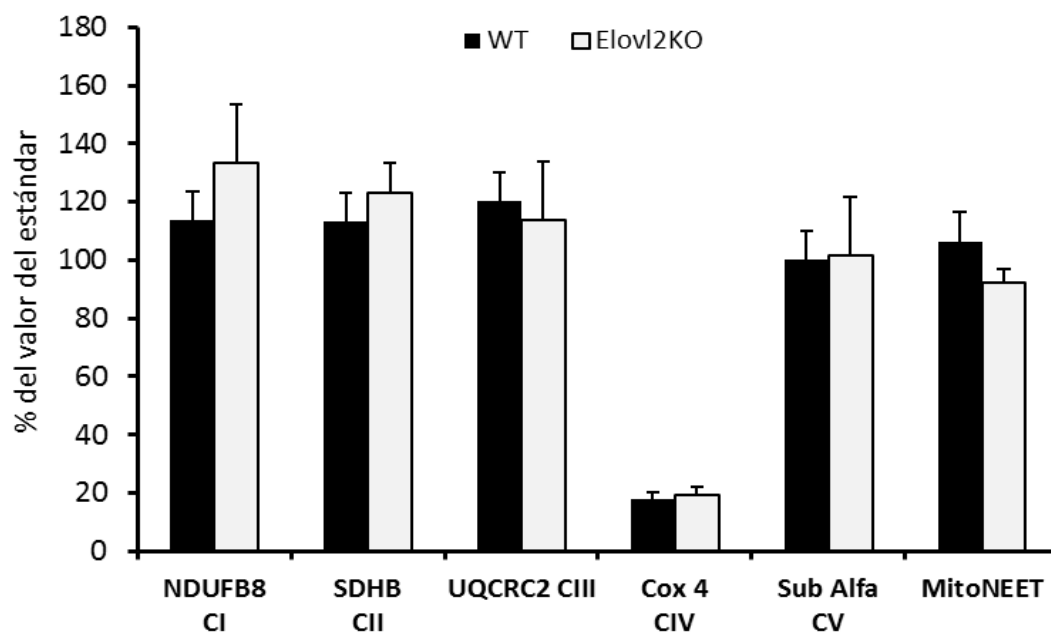
**Figura 55.** Función respiratoria mitocondrial: estudio de la eficiencia mitocondrial y de las tasas de consumo de oxígeno en ratones silvestres (WT) y ratones “Knocked out” para el gen Elov12 (Elov12KO). A) Esquema representativo del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado. Las adiciones fueron las siguientes: 0,5 mg de mitocondrias de hígado (mit); glutamato 5mM en presencia de malato 3mM; ADP 450  $\mu$ M; 3 $\mu$ g/ml de oligomicina y FCCP 0,8  $\mu$ M. El medio contenía BSA 0,2%. B) Fosforilación oxidativa en mitocondrias de hígado de ratones WT y Elov12KO con glutamato como sustrato. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 5-6 animales, examinadas como se describe en el esquema representativo de la figura A. C) Ratio de control respiratorio (ADP/oligomicina) de mitocondrias de hígado de ratones WT y Elov12KO. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo de ratones WT: \*(p < 0,05).

### 3.2. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y mitoNEET

Para elucidar si el descenso en la función mitocondrial fue debido a un descenso en la cantidad de proteínas de la cadena respiratoria, se cuantificaron los niveles de las mismas mediante Western Blot, como se observa en la Figura 56. No se observaron diferencias significativas (p > 0,05) en ninguna de las subunidades de los distintos



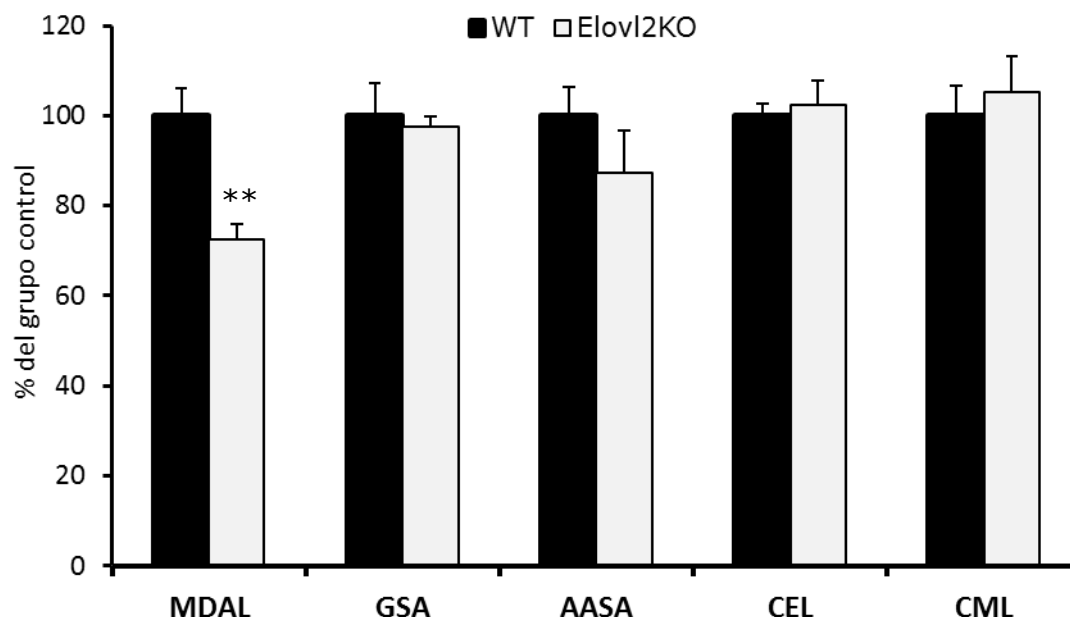
complejos mitocondriales, ni en la cantidad de la proteína de la membrana externa mitocondrial MitoNEET.



**Figura 56.** Cantidad de los complejos I (sub 18KDa NDUF8), II (sub 29KDa, SDHB), III (sub 48KDa, UQCRC2), IV (sub 17 KDa, COX4) y V (sub Alfa 54 KDa) de la cadena respiratoria mitocondrial y la proteína mitoNEET (17 KDa), medidas como el cociente de unidades de proteína/ unidades del estándar (mezcla de todas las muestras con una concentración conocida), en unidades arbitrarias, en mitocondrias de hígado de ratones WT y Elovl2KO. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 5-6 animales.

### 3.3. Daño oxidativo a proteínas

En la Figura 57 se muestran los distintos marcadores de daño oxidativo a proteínas. El marcador de daño lipoxidativo a proteínas MDAL disminuyó significativamente ( $p < 0,01$ ) en los ratones Elovl2KO comparados con los ratones WT (27,56% de descenso). Sin embargo no se detectaron diferencias significativas en el resto de marcadores.



**Figura 57.** Marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo en mitocondrias de hígado de ratones WT y KO para el gen ELOVL2. Valores del grupo de ratones WT:  $4911 \pm 351$  (GSA),  $187 \pm 12$  (AASA),  $263 \pm 7$  (CEL)  $1404 \pm 6$  (CML) y  $237 \pm 14$  (MDAL). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo de ratones WT. \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles} / \text{mol}$  lisina como la media  $\pm$  SEM de 5-6 animales.

### 3.4. Análisis de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales

Se estudió la composición de los ácidos grasos en mitocondrias de hígado de ratón (Tabla 37). Los ácidos grasos linoleico (18:2n-6), araquidónico (20:4n-6), docosapentaenoico de la serie n-6 (22:5n-6) y docosahexaenoico (22:6n-6) fueron significativamente menores en los ratones Elov12KO que en los controles, mientras que los ácidos grasos oleico (18:1n-9), eicosadienoico (20:2n-6), eicosapentaenoico (20:5n-3), el ácido araquídico (20:0), y el docosapentaenoico de la serie n-3 (22:5n-3) se vieron incrementados significativamente en el mismo grupo de ratones con ausencia del gen Elov12.

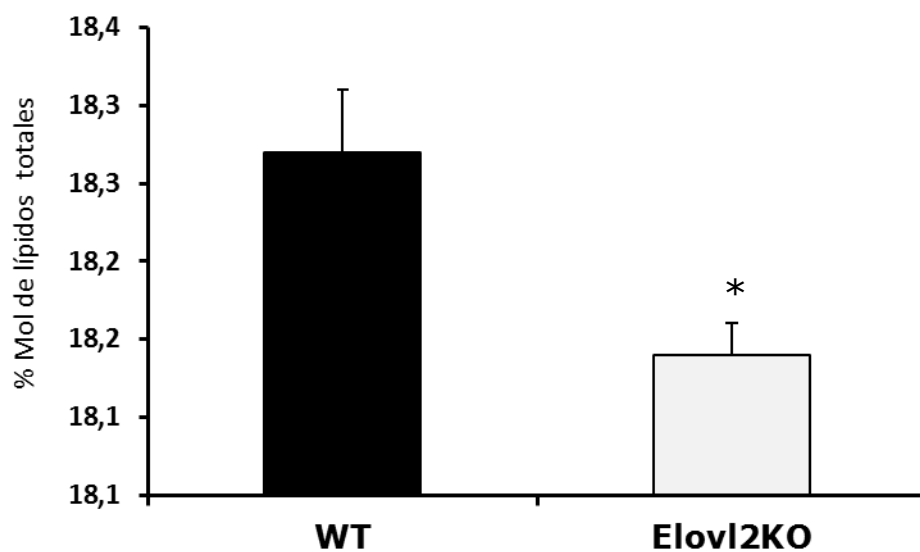
Debido a esta redistribución en los ácidos grasos de la membrana de mitocondrias de hígado, el ACL (Figura 58), los PUFA n-3 y n-6 disminuyeron significativamente en los ratones Elov12KO, mientras que los MUFA aumentaron significativamente en el mismo grupo. No se observaron diferencias significativas en los SFA (Figura 59).

El resultado final fue un fuerte y significativo ( $p < 0,001$ ) descenso (del 17%) en el índice de dobles enlaces (DBI) y en el índice de peroxidizabilidad (PI) (del 32%) en los ratones KO respecto a los ratones WT (Figura 60). Este cambio se debe sobre todo al fuerte descenso observado en el ácido graso 22:6n-3 en los ratones Elov12KO, y al aumento en el 18:1n-9.

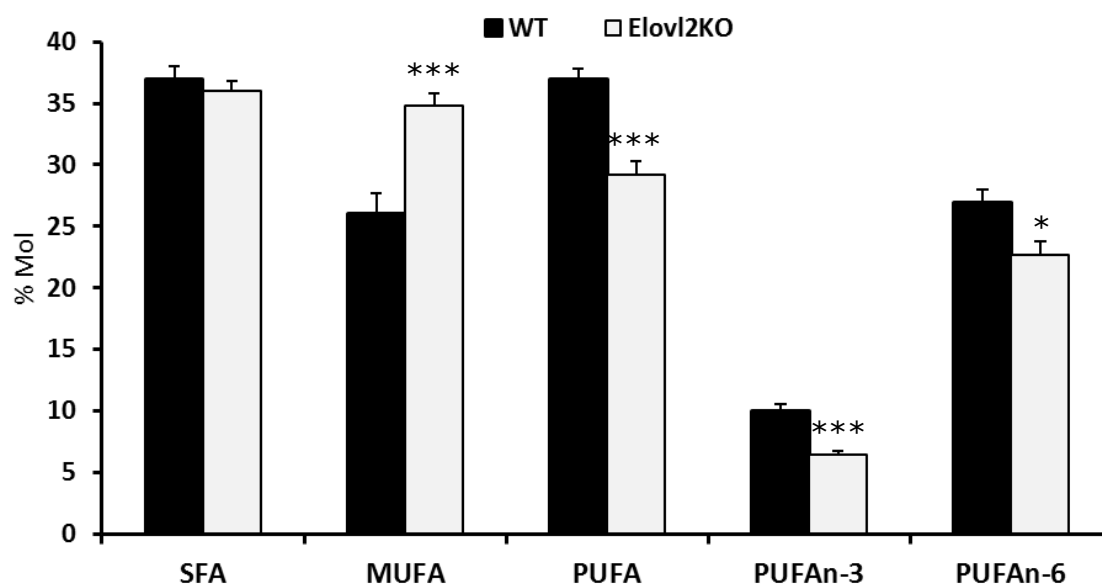
**Tabla 37.** Composición (% mol) de los ácidos grasos de las mitocondrias de hígado de ratones WT y Elovl2KO.

	WT	Elovl2KO
<b>14:0</b>	0.26±0.29	0.31±0.38
<b>16:0</b>	23.67±1.04	21.31±0.49
<b>16:1n-7</b>	1.28±0.14	0.98±1.71
<b>18:0</b>	11.48±0.21	12.46±0.53
<b>18:1n-9</b>	23.79±1.64	32.73±1.04***
<b>18:2n-6</b>	9.78±0.96	7.23±0.50*
<b>18:3n-3</b>	0.56±0.06	0.73±0.11
<b>18:4n-3</b>	0.98±0.22	1.29±0.07
<b>20:0</b>	0.62±0.11	0.68±0.11
<b>20:1n-9</b>	0.98±0.13	1.06±0.08
<b>20:2n-6</b>	0.55±0.04	0.68±0.03*
<b>20:3n-6</b>	3.07±0.24	3.63±0.09
<b>20:4n-6</b>	12.24±0.43	9.97±0.68**
<b>20:5n-3</b>	0.44±0.52	0.77±0.05***
<b>22:0</b>	0.48±0.07	0.82±0.06**
<b>22:4n-6</b>	0.48±0.02	0.62±0.07
<b>22:5n-6</b>	0.86±0.11	0.56±0.03**
<b>22:5n-3</b>	1.18±0.15	2.42±0.18***
<b>24:0</b>	0.41±0.03	0.40±0.05
<b>22:6n-3</b>	6.28±0.23	0.73±1.07***
<b>24:4n-3</b>	0.28±0.06	0.27±0.07
<b>24:6n-3</b>	0.27±0.06	0.26±0.04

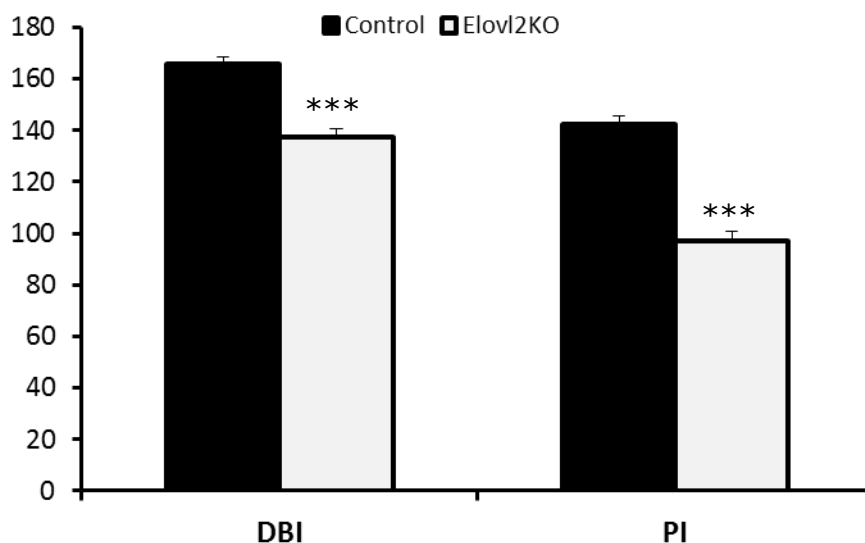
Los resultados se expresan como la media ± SEM de 5-6 animales. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo WT ; \*(p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001).



**Figura 58.** Longitud media de cadena (ACL) en mitocondrias de hígado de ratones WT y Elovl2KO. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo WT; \*( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 5-6 animales.



**Figura 59.** Fracciones lipídicas en mitocondrias de hígado de ratones WT y Elovl2KO. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo WT; \*( $p < 0,05$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-6 animales.



**Figura 60.** Índice de dobles enlaces (DBI) y el índice de peroxidizabilidad (PI) de los lípidos en mitocondrias de hígado de ratones WT y Elovl2KO. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo de ratones WT; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-6 animales.

### 3.5. Estimación de las actividades desaturasa y elongasa

La estimación de las actividades desaturasa y elongasa se muestra en las tablas 38 y 39 respectivamente.

La actividad desaturasa  $\Delta 9$  (n-9) aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) en los ratones Elovl2KO mientras que la  $\Delta 5$  disminuyó ( $p < 0,05$ ) en el mismo grupo.

En cuanto a las actividades elongasa, en el grupo de ratones Elovl2KO se produjo un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de la actividad Elovl6 y las actividades Elovl5 y Elovl 2/5 (n-6) aumentaron también con una significación de ( $p < 0,05$ ). El descenso más fuerte se produjo en la actividad Elovl2 ( $p < 0,001$ ) en los animales Elovl2Ko con respecto a los animales WT.

**Tabla 38.** Estimación de las actividades desaturasa en lípidos de mitocondrias de hígado de ratones WT y Elovl2KO.

DESATURASAS		WT	Elovl2KO
$\Delta 9$ (n-7)	C16:1/C16:0	0.0535 $\pm$ 0.003	0.0460 $\pm$ 0.007
$\Delta 9$ (n-9)	C18:1/C18:0	2.0859 $\pm$ 0.17	2.6505 $\pm$ 0.14*
$\Delta 8$ (n-6)	C20:3/C20:2	5.6942 $\pm$ 0.47	5.3591 $\pm$ 0.24
$\Delta 5$ (n-6)	C20:4/C20:3	4.1343 $\pm$ 0.42	2.7693 $\pm$ 0.25*
$\Delta 6$ (n-3)	C24:6/C24:5	1.0146 $\pm$ 0.12	1.0271 $\pm$ 0.09
$\Delta 6$ (n-6)	C18:4/C18:3	1.6933 $\pm$ 0.29	2.0167 $\pm$ 0.35

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-6 animales. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo WT; \*(p < 0,05).

**Tabla 39.** Estimación de las actividades elongasa en lípidos de mitocondrias de hígado de ratones WT y Elovl2KO.

ELONGASAS		Control	RMet+AT
ELOVL 3 (n-9)	C20:1/C18:1	0.0409 $\pm$ 0.004	0.0326 $\pm$ 0.002
ELOVL 6	C18:0/C16:0	0.4883 $\pm$ 0.015	0.5856 $\pm$ 0.023**
ELOVL 1/3	C20:0/C18:0	0.0548 $\pm$ 0.01	0.0550 $\pm$ 0.009
ELOVL 1/3	C22:0/C20:0	0.8111 $\pm$ 0.09	1.4230 $\pm$ 0.31
ELOVL 1/3	C24:0/C22:0	0.9802 $\pm$ 0.18	0.5251 $\pm$ 0.09
ELOVL 5 (n-6)	C20:2/C18:2	0.0594 $\pm$ 0.008	0.0978 $\pm$ 0.009*
ELOVL 2/5 (n-6)	C22:4/C20:4	0.0396 $\pm$ 0.003	0.0634 $\pm$ 0.007*
ELOVL 2/5 (n-3)	C22:5/C20:5	2.7028 $\pm$ 0.022	3.1498 $\pm$ 0.14
ELOVL2 (n-3)	C22:6/C24:6	28.4241 $\pm$ 4.8	2.9634 $\pm$ 0.35***

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-6 animales. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo WT; \*(p < 0,05), \*\*\*(p < 0,01), \*\*\*(p < 0,001).

## DISCUSIÓN





## 1. EFECTO DEL ATENOLOL EN PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO, EL ENVEJECIMIENTO Y LA LONGEVIDAD:

### 1.1. EFECTO AGUDO DEL ATENOLOL EN CORAZÓN DE RATA WISTAR

Como se ha detallado en la introducción, existen una serie de manipulaciones genéticas capaces de incrementar la longevidad máxima en roedores, la mayoría relacionadas con la vía IIS, TOR y sirtuinas (Selman y Withers, 2011). Sin embargo, cabe destacar el descubrimiento de una nueva mutación relacionada con la señalización  $\beta$ -adrenérgica que, en principio, parece actuar mediante mecanismos independientes a los mencionados anteriormente, incrementando la longevidad media (30%) y máxima (12%) de los ratones mutantes para la adenilato ciclasa tipo 5 (AC5), AC5 *Knockout*, que además están protegidos frente a la pérdida de densidad ósea y al desarrollo de cardiomiopatías relacionadas con la edad (Yan et al., 2007). Según proponen los autores, este incremento de la longevidad podría deberse a la estimulación de la vía Raf/MEK/ERK generada por el bloqueo de la AC5, de manera que se induce la expresión de la enzima MnSOD incrementando la resistencia al estrés oxidativo. Trabajos posteriores realizados en el mismo grupo revelan que la expresión de esta enzima estaría regulada a nivel transcripcional por la vía de señalización SIRT1/FoxO3a (Lai et al., 2013), lo que unido a otros estudios nos deja intuir que tal vez estas dos vías de señalización celular (Raf/MEK/ERK y PI3K/PTEN/Akt/mTOR) no actúen independientemente e interaccionen de alguna manera para regular la expresión de diferentes genes involucrados en la longevidad (Steelman et al., 2011; Yan et al., 2012; Lai et al., 2013). Además existen numerosos estudios que establecen la hipótesis de un posible aumento de la longevidad mediante el bloqueo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica (Milne & Hong, 2004), o por el contrario demuestran que la sobreexpresión de los receptores  $\beta$ -2 adrenérgicos en tejido cardíaco reduce la longevidad en ratones transgénicos (Gao, 2003). Incluso recientemente se ha publicado un estudio en el que se refleja que la cantidad de receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos en humanos está relacionado inversamente con la longevidad (Zhao, 2012).

El bloqueo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica reflejado en el modelo (AC5KO), se puede reproducir de forma sencilla mediante el uso de  $\beta$ -bloqueantes, que son fármacos relativamente seguros, sin efectos secundarios importantes descritos hasta la fecha, y utilizados ampliamente en la población humana durante las últimas 3-4 décadas para tratar la hipertensión y otras patologías cardiovasculares, aumentando la esperanza de vida en pacientes con fallo cardíaco (Mangano et al., 1996; Milne y Hong, 2004). Teniendo en cuenta la relación entre el bloqueo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica y la longevidad, en nuestro grupo de investigación decidimos mimetizar el modelo AC5KO mediante el bloqueo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica ( $\beta$ -AR) con el bloqueante  $\beta$ -1 selectivo atenolol. Tras administrar el fármaco en el agua de bebida a ratones durante dos semanas, no se observaron diferencias en la producción mitocondrial de ROS ni en el daño al ADN mitocondrial, sin embargo si **disminuyó el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas** y sus índices relacionados (DBI, PI), haciéndolas más resistentes al daño oxidativo. Además disminuyó el daño oxidativo a proteínas y aumentó la cantidad de p-ERK demostrando que la AC5 se encuentra bloqueada por la acción del fármaco y la vía de señalización estimulada (Sanchez-Roman et al., 2010).

A la vista de estos resultados iniciales, decidimos poner a prueba este modelo y ver si los efectos eran extensibles a otras especies y pertenecientes a una cepa genéticamente más heterogénea como la rata Wistar. El tratamiento con atenolol durante dos semanas en ratas Wistar de 7 semanas de edad, no modificó el peso corporal, el peso del corazón ni la ingesta de los animales, descartando la posibilidad de que los cambios observados fueran efectos secundarios de la restricción calórica. Tampoco produjo diferencias significativas en la producción de radicales libres de mitocondrias de corazón con ninguno de los sustratos o inhibidores empleados, de acuerdo con los datos obtenidos en corazón de ratón (Sanchez-Roman et al., 2010) y a diferencia de lo que sucede en las modificaciones dietéticas que aumentan la longevidad (Sanz et al., 2004; Gredilla y Barja, 2005; Sanz et al., 2006d). Esto nos llevaría a pensar que la extensión de la longevidad producida por la señalización  $\beta$ -adrenérgica actúa por mecanismos diferentes a la DR, PR y MetR. Sin embargo existen trabajos recientes que indican una cierta similitud entre la expresión genética de los

ratones AC5KO y los sometidos a DR, sobre todo en la regulación del metabolismo lipídico en el hígado, la función muscular, la percepción sensorial en el cerebro y la expresión de la proteína SIRT1 (Yan et al., 2012). Además cuando se superponen ambos modelos (AC5KO y DR), los animales mueren en menos de un mes, lo que indicaría que actúan mediante mecanismos comunes (Lai et al., 2013). En base a los datos obtenidos en la presente tesis, los mecanismos compartidos por la DR y el bloqueo  $\beta$ -AR **no incluirían la disminución en la producción mitocondrial de ROS, ni tampoco la disminución del daño oxidativo al ADN mitocondrial**, que tampoco se vio modificado en el caso del ratón (Sanchez-Roman et al., 2010). La ausencia de cambios en estos dos parámetros sería lógica puesto que ambos varían conjuntamente y en la misma dirección en diferentes modelos de DR y ambos son menores en las especies longevas (Gredilla y Barja, 2005).

La mayoría de los estudios que determinan el papel de los  $\beta$ -bloqueantes en el estrés oxidativo se han llevado a cabo en modelos animales con cardiomiopatías. Los efectos más marcados sobre el estrés oxidativo se han descrito con  $\beta$ -bloqueantes como el carvedilol y el propranolol, mientras que estos efectos no se han descrito en el tratamiento con atenolol. (Rehsia y Dhalla, 2010). En un trabajo realizado en ratas sanas, en el que se comparaba el efecto del atenolol y el metoprolol sobre el estrés nitrooxidativo, se concluyó que solamente el tratamiento con metoprolol fue capaz de reducir este tipo de estrés, pero no el tratamiento con atenolol (Funovic et al., 2008). De acuerdo con estas evidencias y con nuestros datos, parece claro que el atenolol no modifica la producción mitocondrial de radicales libres y el consiguiente daño oxidativo al ADN mitocondrial, sugiriendo que deben existir otros factores que expliquen el incremento de la longevidad en los ratones con la señalización  $\beta$ -adrenérgica interrumpida. Tampoco se detectaron diferencias en el consumo de oxígeno mitocondrial.

El mecanismo de acción propuesto por Yan y colaboradores en el modelo AC5KO, implica un aumento en la cantidad de MnSOD, que es una enzima antioxidante y proporcionaría más resistencia al daño oxidativo. Sin embargo, como se mencionó en la introducción, los antioxidantes no determinan la tasa de envejecimiento, ya que las especies longevas poseen una menor cantidad de enzimas antioxidantes (Lopez-Torres

et al., 1993); el incremento de antioxidantes mediante suplementación en la dieta o sobreexpresión génica no cambia la longevidad máxima (Barja, 2004a); y los ratones *knockout* para enzimas antioxidantes no ven modificada su longevidad (revisado en Sanz et al., 2006a). Además, nuestras ratas tratadas con atenolol muestran niveles significativamente más bajos de la enzima MnSOD, lo que es más coherente teniendo en cuenta el papel de los antioxidantes en el envejecimiento.

Una cadena de transporte electrónico intacta es necesaria para mantener la máxima producción de energía en la mitocondria. Por otra parte, diferentes estudios en roedores indican que la cantidad de complejos respiratorios de la cadena puede variar bajo manipulaciones experimentales que extienden la longevidad. En nuestro estudio, no encontramos diferencias en la cantidad de ninguno de los complejos de la cadena excepto en la subunidad NDUFA9 del complejo I, que fue menor en el grupo tratado con atenolol. En estudios previos con MetR (Caro et al., 2008a) y DR (Desai et al., 1996), también se observa una disminución en la cantidad de complejo I acompañada de una menor producción mitocondrial de ROS en este complejo, al igual que ocurre en las especies longevas (Barja, 2004a). Entonces, el ligero descenso en la cantidad del complejo I observado en nuestro estudio, podría ser responsable de la tendencia a disminuir la producción mitocondrial de ROS en el complejo I que obtuvimos utilizando glutamato/malato como sustrato, y probablemente de la respuesta adaptativa en el contenido de MnSOD.

En cuanto a las demás proteínas estudiadas, AIF es una flavoproteína mitocondrial involucrada en el mantenimiento y ensamblaje del complejo I (Porter y Urbano, 2006), y a la vez juega un papel importante como agente inductor de la apoptosis (Sevrioukova, 2011). En el estudio llevado a cabo para elucidar el objetivo 1 de esta tesis, la cantidad de AIF no se modificó tras el tratamiento con atenolol, de manera similar a lo ocurrido en el caso de los ratones tratados con el mismo fármaco (Sanchez-Roman et al., 2010), lo que sugiere que la disminución en la apoptosis que se observó en el ratón AC5KO se debe probablemente a otros factores independientes de AIF. Por otro lado, el tratamiento con atenolol tampoco modificó los valores de SIRT3, lo que estaría de acuerdo con la ausencia de cambios en la producción mitocondrial de ROS, ya que se ha descrito que SIRT3 incrementa la actividad del complejo I mediante

una interacción directa desacetilando varias de sus subunidades (Bell y Guarente, 2011). Tampoco se detectaron cambios en la cantidad de SIRT5, implicada en inducir la activación de la enzima Carbamil fosfato sintasa I del ciclo de la urea para eliminar amoniaco y prevenir efectos tóxicos en condiciones de limitación de nutrientes como la DR (Nakagawa et al., 2009). La ausencia de variaciones en estas proteínas justifica también la ausencia de cambios en el metabolismo oxidativo (consumo de oxígeno) observado.

Teniendo en cuenta que el atenolol no modificó la generación mitocondrial de ROS ni el daño oxidativo al ADN mitocondrial, nos centramos en el otro parámetro que relaciona el estrés oxidativo y la longevidad: el grado de insaturación de los ácidos grasos. Los fosfolípidos de las membranas son susceptibles a alteraciones oxidativas debido a las propiedades físico-químicas de la bicapa lipídica en la que se encuentran embebidos para formar la membrana. En esa bicapa, el oxígeno y los radicales libres son mucho más solubles que en un medio acuoso (Gamliel et al., 2008). Por esta razón, los lípidos que forman las membranas son altamente sensibles al daño oxidativo. Además esta sensibilidad aumenta exponencialmente en función del número de dobles enlaces por molécula de ácido graso (Holman, 1954). También se ha observado en diferentes especies que el índice de dobles enlaces (DBI) y el índice de peroxidizabilidad (PI) de los ácidos grasos de membrana es menor en las especies longevas que en los animales de vida corta (Pamplona et al., 1996a; Naudi et al., 2013b). **En nuestro estudio, el tratamiento con atenolol disminuyó significativamente el PI (15,20%) y presentó una tendencia a disminuir, aunque de forma no significativa, el DBI (6,49%) en el corazón de rata.**

Los cambios en el DBI observados en las especies longevas son debidos a una redistribución de los ácidos grasos que componen la membrana, de modo que para alcanzar un DBI bajo, se produce una disminución de los ácidos grasos altamente insaturados docosahexaenoico (22:6n-3) y araquidónico (20:4n-6), abundantes en las especies de vida corta, y un aumento de los ácidos grasos menos saturados linoleico (18:2n-6) y en algunos casos linolénico (18:3n-3), presentes en mayor proporción en las especies longevas (Pamplona et al., 2002c). De todos ellos, es el 22:6n-3 el que contribuye en mayor medida a disminuir el índice global de insaturación de los ácidos

grasos. En nuestro caso, encontramos que el tratamiento con atenolol durante dos semanas indujo variaciones en diferentes ácidos grasos en las mitocondrias de corazón de ratas Wistar. **Entre ellas, la más importante fue la disminución del ácido graso altamente insaturado 22:6n-3**, responsable del descenso observado en el PI. Como se ha comentado, este ácido graso se encuentra en una proporción más baja en las membranas de las especies longevas, incluyendo a animales excepcionalmente longevos como el bivalvo *Arctica islandica* (Munro y Blier, 2012), que presenta el record de longevidad animal (502 años) y disminuyó también en los ratones C57BL/6 tratados con atenolol (Sanchez-Roman et al., 2010). Además de esto, también detectamos otros cambios responsables de la disminución de la insaturación de los ácidos grasos (y con ellos del bajo PI) como el descenso de los niveles de los ácidos grasos 20:4n-6, 22:4n-6, 22:5n-6, 22:5n-3 y 22:6n-3; y el aumento del 18:2n-6. Esto es interesante ya que en la cepa de ratones con senescencia acelerada (SAM), el ratón SAM-propenso tiene niveles elevados de los ácidos grasos altamente insaturados 22:6n-3 y 20:4n-6, y niveles más bajos del menos insaturado y menos propenso a la peroxidación 18:2n-6 en sus membranas, presentando como consecuencia un PI más alto que los ratones SAM-resistentes (Choi et al., 1996; Park et al., 1996). Además el ratón SAM-propenso presenta un mayor nivel de peróxidos lipídicos que el ratón SAM-resistente (Matsugo et al., 2000).

¿Cuáles son las consecuencias de este descenso del PI? Un PI y DBI bajos, confieren a las membranas una alta resistencia al ataque de productos altamente reactivos derivados de la peroxidación lipídica, disminuyendo así el daño lipoxidativo a macromoléculas celulares como proteínas. Existen estudios que demuestran que los niveles del marcador específico de daño lipoxidativo a proteínas (MDAL) son menores en el corazón de especies longevas comparadas con especies de vida corta (Ruiz et al., 2005). **En nuestro estudio, la disminución del PI tras el tratamiento con atenolol correlaciona con un remarcable descenso en el MDAL (49% más bajo en el grupo tratado con atenolol)**. La peroxidación lipídica además de generar productos como el MDAL y el hidroxinonenal, también produce radicales libres secundarios. El descenso del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas de los animales tratados con atenolol podría ser responsable de una menor formación de radicales

libres secundarios derivados de lípidos, así como del descenso de marcadores específicos de lipoxidación como el MDAL y el daño a otras macromoléculas (Spiteller, 2010).

Por otro lado, no se produjeron cambios en los marcadores de oxidación a proteínas medidos (GSA y AASA), sin embargo la glicoxidación proteica, cuantificada mediante los niveles de CEL y CML, aumentó en el corazón tras el tratamiento con el fármaco, al igual que sucedió en el caso de los ratones C56BL/6 (Sanchez-Roman et al., 2010). Estos resultados están de acuerdo con otros experimentos en los que se incrementó el grado de insaturación de los ácidos grasos mediante una manipulación dietética, detectando un aumento en el marcador MDAL mientras que los niveles de CEL y CML no se vieron afectados en hígado de rata (Pamplona et al., 2004) y el CML aumentó ligeramente en el caso de corazón (Herrero et al., 2001). Mientras que los niveles de MDAL correlacionan negativamente con la longevidad en el corazón de mamíferos, no se ha encontrado correlación entre la longevidad y los niveles de CML y CEL en el corazón (Ruiz et al., 2005). Aunque nuestros resultados no aclaran porqué se detectaron niveles más altos de estos marcadores, una posible explicación sería que el tratamiento con atenolol podría incrementar los intermediarios glicolíticos a partir de los cuales se formarían los marcadores CEL y CML mediante reacciones químicas con fragmentos oxidados provenientes de carbohidratos como la glucosa.

Los PUFA son generalmente sintetizados mediante la modificación de precursores producto de la ácido graso sintasa o procedentes de la dieta (ácidos grasos esenciales). Este proceso es llevado a cabo por dos tipos de enzimas: desaturasas y elongasas. Los pasos enzimáticos de la elongación comprenden la adición de dos unidades de carbono a un ácido graso-CoA empleando malonil-CoA como donador y NADPH como agente reductor. Hasta la fecha se han descrito 7 enzimas elongasas (ELOVL), de manera que las ELOVL 1, 3 y 7 prefieren ácidos grasos saturados y monoinsaturados como sustrato y las ELOVL 2, 4 y 5 son selectivas para PUFAs (Guillou et al., 2010). Las enzimas desaturasas insertan un doble enlace en un átomo de carbono específico (indicado por el número  $\Delta$ ) en la cadena de ácido grasos de manera que esta se va alargando mediante un incremento de dos carbonos (Nakamura et al., 2004). La ruta de desaturación de los ácidos grasos y el ciclo de deacilación-reacilación,



son los principales mecanismos responsables de la composición de los ácidos grasos de las membranas.

En el presente estudio se estimaron las actividades desaturasa y elongasa, determinando que la actividad desaturasa  $\Delta 5$  (n-6) fue menor en el grupo tratado con atenolol, al igual que ocurre en las especies longevas, las cuales presentan actividades desaturasa  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  varias veces menores que en las especies de vida corta (Hulbert et al., 2002; Pamplona et al., 2002c). Esto puede explicar porque los ácidos grasos 22:6n-3 y 20:4n-6 disminuyen mientras que el 18:2n-6 y el 18:3n-3 aumentan en función de la longevidad en las especies longevas, ya que las enzimas desaturasas actúan como factor limitante en las rutas de síntesis n-3 y n-6 sintetizando los PUFA 20:4n-6 y 22:6n-3 a partir de sus respectivos precursores 18:2n-6 y 18:3n-3 (ácidos grasos esenciales procedentes de la dieta). En general nuestros datos muestran una reducción global de las actividades desaturasa n-3 y n-6 en los animales tratados con atenolol, lo que puede explicar la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos. Las rutas de desaturación dejarían a los ácidos grasos n-3 y n-6 más expuestos a la acción de aciltransferasas para poder remodelar los grupos acilo de los fosfolípidos. El hecho de que el ratio aciltransferasa/desaturasa n-6 sea alrededor de 10:1 en diferentes tejidos (Ivanetich et al., 1996) refuerza la idea de que la regulación de las enzimas desaturasas pueda ser el factor limitante responsable de la relación entre la insaturación de los ácidos grasos y la longevidad (Pamplona y Barja, 2007), así como de los cambios en los ácidos grasos observados en las ratas tratadas con atenolol. En cuanto a las enzimas elongasas, encontramos un descenso de las siguientes actividades en el grupo tratado con atenolol: ELOVL 1/3, que cataliza la formación de ácidos grasos saturados que contienen al menos 26 carbonos; ELOVL 5 (n-6), que cataliza la etapa inicial y limitante de elongación de los c18:2n-6 y C18:3n-3 para producir PUFAs de cadena larga; y las actividades ELOVL 2/5 (n-6) y (n-3) que están implicadas en la elongación de PUFAs C20:3n-6 y C20:4n-3. El descenso de las actividades elongasa en los animales tratados con atenolol podría ser responsable del **descenso significativo de la longitud media de la cadena de ácidos grasos (ACL) en este grupo**.

En resumen, nuestros datos indican que el bloqueo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica mediante el tratamiento con atenolol durante dos semanas, fue capaz de

mejorar parámetros relacionados con el estrés oxidativo y la longevidad, como el grado de insaturación de los ácidos grasos, el PI y el daño lipoxidativo a proteínas, sin inducir cambios en la producción mitocondrial de ROS ni en el daño oxidativo al ADN mitocondrial. Estos cambios beneficiosos podrían ser el producto de la estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK, como se pone de manifiesto en los ratones sometidos al mismo tratamiento (Sanchez-Roman et al., 2010) y en los ratones AC5KO (Yan et al., 2007), que muestran niveles mayores de la proteína p-ERK, la cual entraría al núcleo y regularía la expresión de diferentes genes, entre los cuales podrían incluirse el factor de transcripción SREBP-1c, que modifica la expresión génica de distintas enzimas implicadas en la síntesis de los ácidos grasos (Georgiadi y Kersten, 2012). A la vista de estos datos, y de la sencillez y seguridad del tratamiento, sería muy interesante para futuras investigaciones determinar los efectos del atenolol en otros órganos diferentes al corazón, así como probar diferentes tiempos de acción y comprobar si realmente extiende la longevidad máxima en mamíferos, para quizá, en un futuro, plantear la idea de extrapolarlo a poblaciones humanas.

## 1.2. EFECTO CRÓNICO DEL ATENOLOL EN CORAZÓN Y MÚSCULO DE RATONES B6D2F1 DURANTE TODO EL CICLO VITAL

La Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales libres propone que existen solamente dos factores que correlacionan en el sentido adecuado con la longevidad en las diferentes especies animales: la tasa de producción mitocondrial de ROS (mitROSp) y el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana (revisado en Barja, 2013). **Sin embargo correlación no implica causalidad.** El primero de estos factores, ha sido comprobado experimentalmente en numerosas ocasiones mediante manipulaciones de la dieta como DR, PR y MetR, que son capaces de disminuir la mitROSp (Sanz et al., 2004; Gredilla y Barja, 2005; Sanz et al., 2006d; Sanchez-Roman y Barja, 2013a) y a su vez incrementar la longevidad en roedores (Richie et al., 1994; Miller et al., 2005; Sun et al., 2009) así como mejorar diferentes parámetros haciendo que los individuos experimentales gocen de una mejor salud (Perrone et al., 2012a). Por lo tanto, todas estas evidencias sustentan la idea de que **la baja mitROSp de los animales longevos contribuye causalmente a disminuir la tasa de envejecimiento de las especies longevas.**

Aunque un trabajo reciente en *C. elegans* muestra que la longevidad de diferentes cepas de gusanos longevos mutantes, con un perfil genético parecido, correlaciona con el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana en el mismo sentido en que lo hace en las especies longevas (Shmookler Reis et al., 2011), **no existen investigaciones que relacionen experimentalmente este parámetro con la longevidad en mamíferos.** Esto es debido a las dificultades que conllevan los estudios a largo plazo además de que el grado de insaturación global de los ácidos grasos es controlado por mecanismos homeostáticos que compensan los cambios mediante la transformación de ácidos grasos procedentes de la dieta. Estos mecanismos pueden ser parcialmente abolidos mediante dietas ricas en grasas saturadas (Pamplona et al., 2004), pero esto conduce a niveles poco saludables de ácidos grasos y colesterol en el plasma, lo que las hace inadecuadas para estudios de longevidad.

Sin embargo, como se detalló en el apartado anterior, disponemos de una nueva manipulación experimental capaz de modificar el grado de insaturación de los ácidos grasos: el tratamiento con el bloqueante  $\beta$ -1 adrenérgico atenolol (Sanchez-Roman et al., 2010). **Aprovechando esta capacidad del atenolol, decidimos poner por primera vez a prueba la hipótesis de que la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas puede extender la longevidad en mamíferos.** Además, se midieron una serie de parámetros fisiológicos y bioquímicos en corazón y músculo, órganos elegidos por ser unos de los más afectados por el proceso endógeno de envejecimiento (Dai et al., 2012) compuestos es su mayoría por células postmitóticas.

Aunque el atenolol se ha utilizado durante décadas para tratar patologías cardiovasculares sin efectos secundarios importantes, existen meta-análisis que cuestionan si el uso de atenolol en patologías humanas leves puede incrementar el riesgo de muerte y ser peor que otros fármacos alternativos (Bangalore et al., 2008a; Williams et al., 2012). **Puesto que se desconoce el efecto del atenolol en individuos sanos durante un largo periodo de tiempo, este estudio puede ser útil para evaluar esta cuestión,** importante sobre todo para el campo de la cardiología.

Nuestros datos muestran que el tratamiento con atenolol a largo plazo (16 meses) no modificó el peso corporal de los animales ni el peso de los diferentes órganos (corazón, músculo esquelético, hígado, cerebro, bazo), excepto el riñón y el tejido adiposo visceral, cuyo peso disminuyó en los animales tratados con el fármaco.

Una mayor acumulación de la grasa visceral con la edad en humanos está asociada con enfermedades degenerativas como la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico y la aterosclerosis. Evitar este incremento de grasa es considerado un hábito saludable. En nuestro estudio, **el atenolol mostró una capacidad sustancial de prevenir la acumulación de grasa debida a la edad**. El fuerte incremento en el contenido de grasa visceral de Jóvenes a Viejos Control (424%) fue un 29,5% menor de Jóvenes a Viejos atenolol (Viejos-AT) (299%). El marcado descenso en el contenido de grasa visceral inducido por el tratamiento con atenolol en los ratones Viejos-AT (23,8%) resulta interesante, ya que las intervenciones nutricionales a largo plazo que incrementan la longevidad en mamíferos, como la DR al 40% y la MetR al 80% (Perrone et al., 2013) también disminuyen la grasa visceral por gramo de peso corporal (Malloy et al., 2006) mientras que inducen a su vez una disminución en el crecimiento y en el peso final. Sin embargo en nuestro caso, **esta disminución en la cantidad de grasa visceral no va acompañada de una disminución en la talla corporal**, al igual que ocurre en la MetR al 40% (Sanchez-Roman y Barja, 2013a), aunque el efecto de esta intervención (MetR al 40%) sobre la longevidad máxima no se haya comprobado todavía.

Tampoco encontramos diferencias significativas en parámetros fisiológicos como la tasa metabólica de rutina, la temperatura rectal, los parámetros cardiovasculares (medidos a los 18 meses de edad) ni en el consumo de oxígeno mitocondrial en corazón y en músculo (excepto el incremento en el consumo de oxígeno observado en el estado 3 en el corazón de los ratones viejos, que fue corregido por el tratamiento con atenolol). Todo esto sugiere que, hasta los 18 meses de edad, el tratamiento no produjo efectos secundarios negativos evidentes.

En cuanto a la producción mitocondrial de ROS en corazón, no se observaron diferencias debidas al tratamiento con atenolol (exceptuando la corrección que

efectuó el mismo en el incremento de ROS producidos por el complejo I en los Viejos control, con glutamato/malato+rotenona), de acuerdo con los estudios previos llevados a cabo en corazón de ratón (Sanchez-Roman et al., 2010) y de rata (Objetivo 1 de esta tesis). Ha sido demostrado que el atenolol solo cambia uno de los dos parámetros que correlacionan con la longevidad (el grado de insaturación de los ácidos grasos), pero no la producción mitocondrial de ROS, que si disminuye en la DR al 40%, PR y MetR en todos los tejidos estudiados (Sanchez-Roman y Barja, 2013a). En el caso del músculo esquelético, no encontramos un cambio en la producción de ROS relacionado con la edad, y el atenolol disminuyó la producción mitocondrial de ROS máxima del complejo I (con glutamato/malato+rotenona) en los Viejos-AT en comparación con los Viejos control. El atenolol si fue capaz de disminuir la producción de ROS en los animales Viejos-AT con respecto a los Jóvenes bajo todas las condiciones estudiadas, excepto cuando el flujo reverso hacia el complejo I se encuentra bloqueado (con succinato+rotenona), indicando que estas diferencias proceden del complejo I, el complejo involucrado en la regulación de la producción de ROS durante el envejecimiento (Herrero y Barja, 1997; Barja y Herrero, 1998; Barja, 2013).

Las diferencias observadas en la producción mitocondrial de ROS, no se corresponden con los cambios observados en la cantidad de los complejos de la cadena respiratoria. Esto puede deberse a que en el mismo proceso de envejecimiento, y en las manipulaciones que pretenden retrasarlo, se produzcan una serie de cambios en los diferentes polipéptidos que componen las complejos, revelando la existencia de posibles “subcomplejos”, por lo que cambiaría la estequiometría de los mismos pero no detectaríamos cambios en la cantidad total del complejo ni de sus subunidades. En la actualidad se están desarrollando estudios en proteómica orientados a esclarecer esta cuestión, sin embargo los resultados no han sido todavía publicados. Estas modificaciones podrían traducirse, por ejemplo, en una disminución del potencial de reducción del generador de ROS (la flavina o el centro hierro-sulfurado N2) del complejo I.

Sabemos que existe una correlación negativa entre el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas y la longevidad en las diferentes especies animales estudiadas (Pamplona et al., 2002c; Hulbert et al., 2007; Naudi et al., 2013b). Esto hace

a las membranas más resistentes al daño producido por la peroxidación lipídica, incrementando la sensibilidad a este tipo de daño en función del número de dobles enlaces por molécula. **En nuestro estudio, el tratamiento con atenolol consiguió disminuir significativamente la insaturación global de los ácidos grasos medida como DBI, tanto en corazón como en músculo esquelético (un descenso del 11% y 22.4% respectivamente), además del PI también en ambos tejidos (16,8% y 30,8%).** Estos resultados coinciden con los obtenidos en el tratamiento a corto plazo en ratón (Sanchez-Roman et al., 2010) y en rata (objetivo 1). En cuanto a la intensidad del efecto, en el caso del músculo esquelético, por ejemplo, se obtuvo un descenso del PI en los ratones Viejos-AT similar a los valores obtenidos en mamíferos con una longevidad 5 veces mayor (14,7 años) según los datos obtenidos por Hulbert y colaboradores (Hulbert et al., 2007). Es sumamente interesante el hecho de que tanto el DBI como el PI aumenten significativamente con la edad en los Viejos control con respecto a los Jóvenes (excepto en el caso del DBI en músculo esquelético, en el que se ve una tendencia no significativa) y disminuyan tras el tratamiento con atenolol hasta alcanzar valores similares (o incluso menores en el caso del músculo) a los que presentan los ratones Jóvenes control. De acuerdo con estos datos, el atenolol fue capaz de prevenir los cambios en el perfil lipídico asociados a la edad. Este descenso en el DBI y el PI en los animales tratados con atenolol fue debido principalmente al descenso del PUFA docosahexaenoico (22:6n-3), y al incremento del MUFA oleico (18:1n-9) en ambos tejidos. El ácido docosahexaenoico tiene seis dobles enlaces y en consecuencia cinco hidrógenos bis-alílicos por cadena, lo que implica que es 230 veces más susceptible al ataque de ROS que el ácido oleico (Holman, 1954; Hulbert et al., 2007). Esta redistribución de los ácidos grasos dentro de la membrana, puede llevar a variaciones en la longitud media de la cadena de ácidos grasos (ACL). En nuestro caso esta variación solo se produjo en el caso del músculo, donde el tratamiento con atenolol produjo una disminución en el ACL hasta alcanzar valores incluso menores a los de los jóvenes.

De las rutas de biosíntesis potencialmente responsables del descenso del ácido graso 22:6n-3 y de los índices de insaturación globales, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos fue la más relevante cuantitativamente hablando. Se sabe que esta ruta cataliza

en el peroxisoma los últimos pasos en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga como el 22:6n-3 (Terlecky et al., 2006). El contenido de este ácido graso aumento un 63% en músculo y el 136% en corazón debido a la edad, mientras que el tratamiento con atenolol fue capaz de abolir totalmente este efecto. La reversión de los efectos de la edad gracias al atenolol puede deberse también a cambios en las enzimas desaturasas y elongasas, como se puede ver en el caso del corazón en el que la desaturasa delta-6 aumentó en los animales tratados con atenolol contribuyendo a disminuir el DBI y el PI. Por otro lado, el descenso de la desaturasa delta-9 en Viejos Control y su aumento en los Viejos Atenolol, puede explicar el mismo tipo de cambios que sufrió el ácido graso 18:1n-9 en corazón. Sin embargo en músculo no se observaron diferencias significativas en la actividad de esta enzima. Estos resultados son análogos a lo que ocurre cuando se comparan especies con diferentes longevidades (Pamplona et al., 2002a; Hulbert et al., 2007; Naudi et al., 2007) y también en un trabajo llevado a cabo en *C. elegans* en el cual el silenciamiento mediante RNAi de los genes que codifican para algunas desaturasas y elongasas incrementó la longevidad de los gusanos (Shmookler Reis et al., 2011).

Estos cambios en el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas, no afectan solamente a los lípidos de membrana, sino también a las proteínas y al ADN mitocondrial, que se sitúa cerca o incluso en contacto con las membranas internas mitocondriales. De acuerdo con esto, los cinco marcadores de daño oxidativo a proteínas (oxidación, glicoxidación y lipoxidación) incrementaron con la edad, y todos los cambios (excepto en el marcador CEL en músculo) fueron revertidos totalmente mediante el tratamiento con atenolol volviendo a los niveles observados en ratones jóvenes. La modificación oxidativa a proteínas aumenta con la edad (Kastle y Grune, 2011), mientras que las manipulaciones experimentales que extienden la longevidad, como la DR (Dhahbi et al., 2001; Pamplona et al., 2002b) y MetR (Caro et al., 2008a; Caro et al., 2009) disminuyen estos niveles de daño a proteínas incluso cuando se aplican en animales viejos (Sanchez-Roman et al., 2012). Esto ha sido relacionado con cambios en el catabolismo de las proteínas modificadas en los modelos descritos, pero nuestros resultados indican que la elevada insaturación de los ácidos grasos de las membranas puede tener un papel importante. La

peroxidación lipídica conduce a la formación de radicales secundarios que generan oxidación y glicoxidación a proteínas, y metabolitos tóxicos como el 4-HNE (Spiteller, 2010) o MDA, que pueden difundir y reaccionar con otras macromoléculas, incluyendo proteínas, y condicionando la producción de aductos como el CML o el MDAL. Los cambios más notables se produjeron en el marcador MDAL, que descendió notablemente en los ratones tratados con atenolol al igual que ocurrió en otros modelos en los que se consiguió un incremento de la longevidad.

En cuanto al daño infligido al ADN mitocondrial, medido como 8-oxodG, puede ser generado por la acción de radicales secundarios producto de la lipoxidación, o por el ataque directo de los ROS mitocondriales producidos en el complejo I que son dirigidos hacia la matriz mitocondrial donde se encuentra el ADN. Los niveles de 8-oxodG tendieron a aumentar en el ADN mitocondrial con la edad (especialmente en el caso del músculo) y a disminuir tras el tratamiento con el fármaco, aunque solo se obtuvieron diferencias significativas en el caso del corazón. Esto demuestra que, al igual que ocurre en otros modelos, no solo la producción mitocondrial de ROS condiciona el nivel de daño al ADN mitocondrial, sino que también la producción de radicales secundarios por peroxidación lipídica podría dañar el ADN que está muy cerca o incluso en contacto con la membrana mitocondrial interna. Esto se ha visto en otros estudios en los que se disminuyó el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana mediante la administración de una dieta rica en ácidos grasos saturados, obteniendo un descenso en los niveles de CML y MDAL en las proteínas así como los niveles de 8-oxodG en el DNA mitocondrial (pero no en el DNA nuclear) en cerebro y riñón de rata (Pamplona et al., 2004).

Tanto la edad como el tratamiento con atenolol afectaron también a una serie de funciones fisiológicas importantes como la inmunidad y el comportamiento, de forma similar a los cambios observados en el perfil lipídico y los marcadores de daño oxidativo. Respecto a los parámetros relacionados con el sistema inmune, en experimentos previos llevados a cabo en otras cepas de ratón (CD1 y BALB/c) y en ratas se observó que las tres funciones inmunitarias estudiadas en la presente tesis (la respuesta quimiotáctica, la linfoproliferación y la actividad *natural killer*, NK) se vieron afectadas negativamente por la edad en leucocitos procedentes de diferentes



localizaciones como peritoneo, timo, nódulos linfáticos y bazo (De la Fuente et al., 2004; De la Fuente, 2008). **En nuestro estudio esta relación se cumple en el caso de la quimiotaxis y la actividad NK.** En el caso de la linfoproliferación no se observaron diferencias significativas, pero si una ligera tendencia tras la estimulación con LPS, que hizo disminuir el porcentaje de linfocitos con la edad y aumentar en los ratones viejos tratados con atenolol. Estos datos pueden deberse a que las diferencias en las funciones inmunes entre viejos y jóvenes dependen de varios factores, entre ellos la cepa de ratones estudiada, las edades comparadas, el método utilizado, etc. (De la Fuente et al.).

La capacidad de quimiotaxis, que muestra la migración de los leucocitos hacia el foco inflamatorio, constituye uno de los primeros pasos de la respuesta inmune. En nuestro estudio, y corroborando estudios previos (De la Fuente et al., 2004; Viveros et al., 2007) **observamos cómo esta función se deteriora con la edad en linfocitos esplénicos para recuperarse gracias al tratamiento con atenolol**, lo que confiere a esos linfocitos una ventaja para llegar al foco infeccioso.

La actividad NK se considera la primera línea de defensa contra las infecciones virales y las células neoplásicas (Stopinska-Gluszak et al., 2006). A pesar de ciertas controversias acerca de los efectos de la edad sobre este parámetro, es la función inmune cuyo descenso correlaciona con el envejecimiento en la mayoría de los estudios realizados (Guayerbas et al., 2002a; De la Fuente et al., 2004; Viveros et al., 2007; de la Fuente et al., 2008). Nuestros resultados van en la misma dirección que estos trabajos, ya que **se produjo una disminución de la actividad NK en los linfocitos de bazo de los animales viejos que se recuperó tras el tratamiento con atenolol alcanzando valores similares a los de los ratones jóvenes.** Además se ha demostrado que el atenolol aumenta varias capacidades de las células inmunes *in vitro* (Guo et al.), sin embargo este fenómeno no se había descrito *in vivo* hasta la fecha.

También se estudió el comportamiento de los animales, con una batería de pruebas y test comportamentales. Según estudios previos, las habilidades sensomotoras, la coordinación motora y el vigor muscular empeoran con la edad (Baeza et al., 2010). **En nuestro experimento a largo plazo con atenolol, observamos**

**que la edad disminuyó el equilibrio, la coordinación muscular y el vigor muscular en ratones y que estos parámetros se recuperaron totalmente (en el caso del equilibrio) o parcialmente en los ratones viejos tratados con atenolol.** Además, el atenolol aumentó el porcentaje de ratones viejos que presentaron postura erguida (*rearing*) en el centro del campo abierto, estimando así la actividad exploratoria vertical no dirigida (Escorihuela, 1999), lo que indica el interés o habilidad del animal para interactuar con el ambiente. La defecación y la incontinencia urinaria también aumentaron en los ratones viejos control. En los ratones viejos tratados con atenolol se detectó un descenso de estos parámetros con respecto a los Viejos control, lo que indica un nivel más bajo de ansiedad en estos animales. Estos resultados están de acuerdo con los menores niveles de ansiedad (Deary et al., 1991) y depresión (Al-Tubuly et al., 2008) obtenidos en humanos tras el tratamiento con atenolol.

**A pesar de que el atenolol administrado a largo plazo disminuyó el estrés oxidativo y mejoró parámetros relacionados con el comportamiento y la inmunidad, no logró extender la longevidad media, mediana ni máxima en los ratones tratados.** Una posible razón sería la gran longevidad que mostraron nuestros controles, alcanzando los 47,1 meses (3,93 años) de máxima, 31 meses de media y 32 de mediana. Estos valores son más altos que los mejores obtenidos previamente para la cepa B6D2F1, la utilizada en nuestro estudio (F<sub>1</sub> resultante del cruce de las cepas C57BL/6 x DBA/2N), que fue de 25,7 meses para la longevidad media y de 3 años para la máxima (Yamate et al., 1990). La longevidad mediana (32 meses) y máxima (47,1 meses) de nuestros controles, fue parecida o incluso mayor (en el caso de la máxima) que la de los ratones longevos AC5KO (C57BL/6 x 129vJ), que fue de 33 y 37 meses para la mediana y la máxima respectivamente. Estos ratones, que presentan la vía Raf/MEK/ERK estimulada, igual que en el caso del atenolol (reflejado en el incremento de la cantidad de proteína p-ERK en los ratones tratados, tanto en corazón como en músculo), presentan sin embargo una aumento considerable de la longevidad con respecto a sus controles (25 y 33 meses respectivamente en los controles) (Yan et al., 2007). Es conocido en los estudios clásicos de longevidad, que un incremento de la misma se obtiene con mayor facilidad cuando la longevidad de los controles se encuentra en la parte inferior del rango establecido para esa especie o cepa; pero es

raro que se produzca dicho incremento cuando la longevidad de los controles está cercana al máximo estimado [ver Tabla 1 en (Barja, 2013)]. La dificultad de aumentar la longevidad media teniendo unos ratones control tan longevos radica en que **es difícil hacer más rectangular una curva que ya es muy rectangular de por sí**, como se puede apreciar en la curva de supervivencia de nuestros controles (Fig. 1.2.13 de la sección de resultados).

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que el bloqueo de la expresión de dos enzimas relacionadas con la biosíntesis de PUFAs en *C. elegans* disminuyó el DBI y el PI, al igual que en estudios comparados entre especies (Naudi et al., 2013b) y que en nuestro estudio a largo plazo con atenolol; y esos cambios fueron capaces de incrementar la longevidad de los gusanos (Shmookler Reis et al., 2011). Esto demuestra la existencia de una relación causal entre las enzimas desaturasas/elongasas, el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas y la longevidad. Otra posible razón por la que el atenolol no logró incrementar la longevidad, **es que este fármaco actúa en un punto más lejano dentro de la ruta de señalización que conduciría finalmente a cambios en los ácidos grasos** (receptores  $\beta$ -adrenérgicos-AC-Raf/MEK/ERK-señalización al núcleo-cambios en la ruta de biosíntesis de PUFAs-modificación del DBI); comparado con los experimentos realizados en *C. elegans*, en los que se corta directamente la expresión de dichas enzimas mediante RNAi. Cuanto más lejos de la diana se produce la modificación, es más probable que se produzcan interconexiones durante la señalización celular cuyos efectos metabólicos den lugar a efectos secundarios perjudiciales. Los posibles efectos secundarios causados por el atenolol a lo largo de nuestro estudio, podrían haber sido compensados por sus numerosos efectos beneficiosos, de modo que finalmente no se observaron cambios en la longevidad con respecto a los controles. No obstante, como se detallará más adelante, **observamos efectos negativos relacionados con la función cardiovascular solamente al final del ciclo vital de los ratones (entre los 1.000 y los 1.275 días)**, mientras que otros posibles efectos negativos a edades más tempranas no fueron detectados debido a la selección de los parámetros medidos. Además de todas estas razones, se sabe que para extender la longevidad **no es suficiente con modificar un solo parámetro, sino que son necesarios cambios simultáneos y coordinados en**

**diferentes parámetros** (Barja, 2008). Todo esto podría explicar la ausencia de cambios en la longevidad en nuestro estudio.

Esta ausencia de cambios en la longevidad tras el tratamiento con atenolol sigue la misma línea que estudios anteriores con fármacos y otras pequeñas moléculas que pretendían retrasar el envejecimiento, ya que ni la aspirina, ni antidiabéticos como la metformina, ni el resveratrol, melatonina u otros fármacos han demostrado cambios consistentes en la longevidad (revisado en Spindler, 2012). La única excepción es la rapamicina, que consiguió un incremento en la longevidad máxima del 4-14%, obteniéndose los mismos resultados en tres laboratorios diferentes (Harrison et al., 2009). Sin embargo, mutaciones puntuales en diferentes genes sí han conseguido incrementar la longevidad máxima hasta un 40% (revisado en Selman y Withers, 2011), lo que sugiere que son los efectos secundarios de los fármacos los responsables de esta diferencia de resultados positivos sobre la longevidad. **Por lo tanto para demostrar la relación causal entre el bajo grado de insaturación de los ácidos grasos y la longevidad, sería probablemente más útil pensar en manipulaciones genéticas para así evitar resultados enmascarados por los efectos secundarios de los fármacos.** Por ejemplo, existe un modelo de ratón con una disrupción en el gen FADS2 que codifica para la desaturasa  $\Delta 6$ , que resultó viable pero estéril, además de sufrir diferentes patologías incluyendo dermatitis ulcerosa, esplenomegalia y úlcera intestinal (Stoffel et al., 2008; Stroud et al., 2009). Este hecho probablemente se deba a que la ausencia total de la enzima resulte perjudicial para el correcto funcionamiento del organismo, ya que ciertos niveles de ácidos grasos insaturados son necesarios para el correcto funcionamiento del mismo. La solución entonces sería conseguir disminuir la actividad de alguna de estas enzimas pero sin bloquear su actividad por completo. Por suerte, se ha conseguido un modelo de ratón con la enzima  $\Delta 6$  inhibida que muestra una remodelación de los ácidos grasos que componen la cardiolipina, de manera que se produce un aumento del ácido linoleico y un descenso de los ácidos grasos araquidónico y docosahexaenoico, disminuyendo de este modo el PI, mejorando la función cardíaca (Mulligan et al., 2014). Por lo tanto sería muy interesante comprobar si este tipo de modificaciones (menos drásticas que la supresión completa de un gen) podrían aumentar la longevidad máxima poniendo a

prueba la hipótesis de la influencia de la insaturación de los ácidos grasos sobre la longevidad (Pamplona et al., 1996a; Pamplona et al., 2002c).

Recientemente se ha publicado un estudio similar al nuestro (Spindler et al., 2013), en el que se trató a los ratones (B6C3F1) con dos bloqueantes  $\beta$ -1, metoprolol o nebivolol, mezclados en la dieta. El tratamiento comenzó a los 12 meses de edad. Dichos fármacos provocaron un aumento en la longevidad media del 10% y el 6,4% respectivamente, pero no se produjeron cambios en la longevidad máxima, si bien observando las curvas de supervivencia de estos animales, parece que los animales tratados con  $\beta$ -bloqueantes vivieron menos (aunque el descenso no fue significativo) que los animales control. La longevidad máxima y mediana de estos animales (alrededor de 1.400 y 983 días respectivamente) fue muy parecida a la que se obtuvo en nuestro estudio (1.433 y 967 días). Aunque los resultados obtenidos en ambos estudios fueron similares, las diferencias observadas pueden deberse a diferencias en el diseño experimental, como el uso de diferentes cepas, diferentes bloqueantes  $\beta$ -1, así como diferentes dosis y vías de administración. Además, el estudio llevado a cabo por Spindler y colaboradores, comenzó cuando los ratones tenían 12 meses de edad, mientras que nosotros empezamos a tratar a los ratones a los 2 meses. Lo más interesante, es que en el estudio de Spindler, encontraron un descenso significativo en el peso de los animales así como **una mayor mortalidad tanto con metoprolol como con nebivolol en el periodo comprendido entre los 1.245-1.250 días de edad**. Los autores sugirieron que este aumento en la mortalidad se debería a la toxicidad leve de ambos fármacos en los ratones viejos debido a la disfunción del hígado provocada por la edad. **Este resultado es muy similar al aumento de mortalidad en los ratones tratados con atenolol de nuestro estudio que tuvo lugar entre los 1.000-1.275 días**, y que está de acuerdo con diferentes meta-análisis sobre humanos hipertensos.

Se ha demostrado que el atenolol incrementa la supervivencia en humanos tras sufrir infarto de miocardio y previene la muerte prematura en pacientes con enfermedades coronarias y fallo cardíaco. Sin embargo, existen meta-análisis que indican que los  $\beta$ -bloqueantes aumentan la mortalidad en humanos hipertensos (Lindholm et al., 2005; Cockcroft y Pedersen, 2012). Comparados con otros fármacos anti-hipertensivos, los  $\beta$ -bloqueantes muestran alta tasa de mortalidad debida a fallos

en el sistema cardiovascular asociados a un fuerte descenso en la frecuencia cardiaca. Además el uso de  $\beta$ -bloqueantes ha sido cuestionado en pacientes de edad avanzada (Lindholm et al., 2005), y se dispone de muy poca información sobre los diferentes efectos del atenolol en función de la edad. Así los efectos negativos del atenolol pueden deberse al descenso en la frecuencia cardiaca, que desciende ineffectivamente o incluso aumenta la presión central de la aorta disminuyendo la presión diastólica, o mediante efectos negativos en el metabolismo de lípidos y glucosa (Bangalore et al., 2008b).

**Cuando limitamos los análisis estadísticos a la ventana de tiempo comprendida entre los 1.000 y los 1.275 días, el atenolol produjo un aumento significativo en la tasa de mortalidad.** Esto demuestra que el atenolol puede aumentar la mortalidad en individuos muy viejos, pero no en individuos jóvenes o de edad media, lo que estaría de acuerdo de nuevo con los meta-análisis realizados en humanos, especialmente debido a que la hipertensión es más frecuente en pacientes de edad avanzada. Además estos pacientes no suelen ser medicados hasta más o menos la mitad de su vida, cuando se diagnostica la patología, sin embargo siguen mostrando una mayor mortalidad inducida por el tratamiento con atenolol. **En nuestro estudio encontramos un descenso en la presión arterial (tanto media, como sistólica y diastólica) del 8-13% en los animales tratados con atenolol, y especialmente en la frecuencia cardiaca, que disminuyó en este grupo un 20%, en el mismo periodo de tiempo en que se incrementó la mortalidad en el grupo con atenolol** (ratones muy viejos, 35 meses de edad), pero no en ratones jóvenes o de mediana edad (18 meses), en los que no se detectaron diferencias en los parámetros cardiacos ni en la mortalidad. Este descenso en la frecuencia cardiaca coincide con el principal efecto negativo del atenolol en humanos hipertensos (Bangalore et al., 2008b). Los descensos en la frecuencia cardiaca y el gasto cardiaco inducidos por el atenolol en ratones viejos así como los picos transitorios en la presión arterial debidos a la regulación deficiente de la presión sanguínea en los animales muy viejos, que además presentan degeneraciones en el miocardio debidas al daño ocasionado por la edad y las arterias principales endurecidas por la aterosclerosis, pueden conducir a un fallo cardiaco. Estos procesos no existen, o son mejor tolerados en animales jóvenes, en los que la frecuencia y

presión cardiaca fue normal a los 18 meses de edad. Así, estos efectos secundarios del fármaco pudieron contrarrestar los efectos positivos observados en el estrés oxidativo, comportamiento e inmunidad, ayudando a explicar porque el tratamiento con atenolol no aumentó la longevidad a pesar de los efectos beneficiosos descritos.

### **1.3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA Y EL TRATAMIENTO A MEDIO PLAZO CON ATENOLOL EN HÍGADO DE RATA WISTAR**

Como se ha puesto de manifiesto a lo largo de esta tesis, las especies longevas muestran un bajo grado de producción mitocondrial de ROS y un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de sus membranas (Pamplona y Barja, 2011). También hemos visto que estos parámetros se pueden modificar experimentalmente mediante modificaciones en la dieta (DR, PR y MetR), en el caso de la producción mitocondrial de ROS, y mediante el tratamiento con atenolol, en el caso de la insaturación de los ácidos grasos de membrana. En nuestro grupo de investigación se puso a prueba anteriormente el efecto conjunto de estos dos tratamientos en corazón de rata (Sanchez-Roman et al., 2013), observando que ambos tratamientos tenían efectos aditivos en cuanto a la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos, las cantidades de los complejos II y III, la cantidad de p-ERK y el daño oxidativo a proteínas; y que la MetR fue capaz de revertir el aumento de ROS mitocondriales inducido por el atenolol.

Ya que el atenolol es un  $\beta$  bloqueante con una fuerte cardioselectividad por los receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos (Berthonneche et al., 2009), nos preguntamos si los cambios beneficiosos se extenderían a nivel global del organismo y no solamente a nivel del principal órgano diana. Por ello, **decidimos enfocar nuestro estudio hacia otros órganos con una menor cantidad de receptores  $\beta$ -1 (Jin, 2010) y con gran relevancia metabólica y nutricional como es el caso del hígado.**

Ninguno de los dos tratamientos indujo cambios en el peso corporal ni en el peso de los diferentes órganos a excepción del corazón, cuyo peso aumentó en los animales tratados con atenolol tanto solo como en combinación con MetR. Este efecto del atenolol no se observó en las ratas tratadas durante dos semanas con el fármaco

(Objetivo 1) ni en los ratones tratados durante 18 meses (Objetivo 2), por lo que este efecto puede ser dependiente tanto de la especie como del tiempo de exposición al fármaco.

La restricción de metionina al 40% durante 7 semanas disminuyó significativamente la producción máxima de ROS en el complejo I de mitocondrias de hígado de rata, de acuerdo con el resto de trabajos llevados a cabo con esta intervención en diferentes órganos (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2008a; Caro et al., 2009b; Sanchez-Roman et al., 2011; Sanchez-Roman et al., 2012). Aunque con ausencia de significación estadística, **se observó un aumento en dicha producción de ROS en las ratas tratadas con atenolol, siendo este aumento revertido por el tratamiento conjunto (MetR+AT)**, de acuerdo con lo obtenido en trabajos previos (Sanchez-Roman et al., 2013); pero a diferencia de los efectos observados en los Objetivos 1 y 2 de esta tesis y en publicaciones anteriores (Sanchez-Roman et al., 2010), en los que el tratamiento con atenolol no indujo diferencias en este parámetro, por lo que de nuevo estas diferencias pueden deberse a diferencias en la dosis, el tiempo de exposición al fármaco, y la especie elegida en el diseño experimental. Por lo tanto, el tratamiento combinado de ambas intervenciones evita el efecto negativo sobre la producción mitocondrial de ROS inducido por el atenolol.

Este descenso en la producción mitocondrial de ROS inducido por la MetR puede deberse al descenso en la cantidad de las dos subunidades del complejo I (NDUFA9 y NDUFS3) en los animales sometidos a MetR, al igual que en estudios anteriores con MetR en hígado (Caro et al., 2008a). Estas dos subunidades descendieron también tras el tratamiento con atenolol y con la combinación de ambos, aunque en estos casos el descenso no fue acompañado de un descenso en la producción de ROS. Al igual que el complejo I, la cantidad de los complejos II, III y IV disminuyó en los animales con dieta MetR de acuerdo con estudios con MetR al 40% realizados en hígado (Caro et al., 2008a).

**En relación con la menor cantidad de complejo I, la proteína AIF disminuyó también significativamente en los dos grupos de animales con dieta restringida en metionina.** Esta proteína ha sido implicada en el ensamblaje y mantenimiento del



complejo I (Porter y Urbano, 2006). Además se ha visto tanto en células como en ratones deficientes en AIF, un menor contenido de las subunidades que forman el complejo I (Vahsen et al., 2004), señalando un papel de AIF en la biogénesis o mantenimiento de este complejo.

Con respecto al segundo factor que correlaciona con la longevidad máxima en diferentes especies, **el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana (reflejado en los índices DBI y PI), no se observaron diferencias en ninguno de los grupos experimentales con respecto al control.** En cuanto al efecto de la dieta, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en trabajos previos realizados en el mismo órgano y en la misma especie, además de con el mismo porcentaje (40%) de restricción de metionina en la dieta (Caro et al., 2008a), mientras que ambos índices relacionados con la composición lipídica (DBI y PI) si disminuyeron significativamente cuando la restricción de metionina aplicada fue del 80% (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2008a). Esto indica que posiblemente el efecto de la MetR al 40% sea insuficiente para modificar la composición lipídica de las membranas. La MetR al 40% no indujo cambios en estos parámetros en ningún órgano estudiado, salvo en el caso de corazón de rata (Sanchez-Roman et al., 2013), aunque no en otros estudios realizados también en corazón de la misma especie (Sanchez-Roman et al., 2011). Esta paradoja puede deberse a que la composición de las dietas en ambos experimentos fue diferente. Aunque la MetR al 40% parece no tener efectos directos sobre la composición lipídica, serían necesarios más estudios para elucidar si estos efectos son específicos de tejido.

En cuanto al tratamiento con atenolol, este redujo significativamente el DBI y el PI en todos los casos anteriores al presente trabajo (Objetivos 1 y 2 de esta tesis) y (Sanchez-Roman et al., 2010; Sanchez-Roman et al., 2013), pero en todos ellos el órgano objeto del estudio fue el corazón (o también el músculo en el Objetivo 2), con una alta presencia de receptores  $\beta$ -1. Por lo tanto estos datos sugieren que el efecto del atenolol en la reducción del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas, con su consiguiente mejora en la resistencia a la peroxidación lipídica, no puede extrapolarse a otros órganos con una menor expresión de receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos como el hígado.

A diferencia con las especies longevas, en las que tanto el ácido araquidónico (20:4n-6) como el docosahexaenoico (22:6n-3) se encuentran disminuidos, mientras que el ácido linoleico (18:2n-6) y el oleico (18:1n-9) aumentan, (este último en el caso de las aves); en el presente trabajo ni el atenolol, ni la MetR, ni ambos tratamientos en conjunto fueron capaces de inducir diferencias en los niveles de estos ácidos grasos. Esto difiere de nuevo con los resultados obtenidos en los objetivos anteriores, que muestran como en el caso del Objetivo 1 el tratamiento durante dos semanas con atenolol disminuyó los niveles de los citados ácidos grasos (20:4n-6 y 22:6n-3) y aumentó los del ácido linoleico en corazón de rata. En el caso de corazón y músculo de ratón (Objetivo 2), el atenolol disminuyó en ambos casos los ácidos araquidónico y docosahexaenoico, y aumentó el oleico en el caso de corazón, y tanto el oleico como el linoleico en el caso del músculo. En nuestro caso, ninguno de los tratamientos produjo cambios relevantes en la composición lipídica, reflejado en la ausencia de cambios en el DBI y el PI.

De forma similar a lo sucedido en estudios con restricción de dieta y con restricción del aminoácido metionina (Sanchez-Roman et al., 2013), **los niveles de los marcadores de daño oxidativo a proteínas (GSA y AASA) disminuyeron significativamente tras la MetR al 40%**, tanto cuando el tratamiento se aplicó solo como en combinación con atenolol. En los dos grupos alimentados con una dieta MetR, los niveles de estos marcadores descendieron con respecto al grupo control y en el caso del tratamiento combinado también se detectaron diferencias con respecto al grupo atenolol. Sin embargo el tratamiento con atenolol no produjo cambios en estos marcadores, al igual que en el caso de corazón de rata (Objetivo 1) pero a diferencia de lo sucedido en corazón y músculo de ratón (Sanchez-Roman et al., 2010) y Objetivo 2, en los que el tratamiento con atenolol si disminuyó los valores de GSA y AASA. En el caso de ambos tratamientos combinados en corazón de rata, se detectó un mayor descenso de estos marcadores que el descenso ofrecido por los tratamientos separados (Sanchez-Roman y Barja, 2013a). **Respecto al marcador de lipoxidación, MDAL, su cantidad varió del mismo modo que los marcadores de oxidación GSA y AASA, disminuyendo solo debido a la acción de la MetR**, de nuevo en consonancia con trabajos anteriores con dietas restringidas en metionina. Sin embargo, la ausencia

de efecto del atenolol sobre el MDAL en hígado discrepa de los casos mencionados en los que se estudió el efecto del atenolol en corazón, en los cuales se halló un descenso significativo de éste marcador de daño lipoxidativo a proteínas. **Por último, los niveles de los marcadores de glicoxidación proteica (CEL y CML) descendieron tras el tratamiento con MetR y el MetR+atenolol**, de acuerdo con otros estudios similares en los que se combinó MetR y tratamiento con atenolol (Sanchez-Roman et al., 2013). En cambio no se observaron diferencias específicas debidas al tratamiento con atenolol, a diferencia de los estudios anteriores con el fármaco. En el caso de ratas tratadas durante 7 semanas con atenolol, se detectó una disminución del CML en mitocondrias de corazón (Sanchez-Roman et al., 2013), al igual que en ratones tratados con atenolol durante 18 meses (Objetivo 2). Sin embargo, ambos marcadores de glicoxidación aumentaron en las ratas tratadas con atenolol durante dos semanas (Objetivo 1). Estos datos manifiestan de nuevo la especificidad del efecto del atenolol sobre su órgano diana (el corazón) o tejidos similares con mayor cantidad de receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos (como el músculo esquelético), así como las diferencias que se presentan respecto a la duración del tratamiento. El descenso en los marcadores de modificación proteica ocasionado por la MetR podría deberse a la menor producción de ROS observada por parte del complejo I, o a un aumento del catabolismo de las proteínas modificadas (Dhahbi et al., 2001).

**De igual manera que la producción de ROS por parte del complejo I fue menor en los animales sometidos a MetR, el daño oxidativo al ADN mitocondrial también disminuyó significativamente en este grupo experimental.** Ambos parámetros varían de forma conjunta y en el mismo sentido tanto en DR como en MetR al 80% (Lopez-Torres y Barja, 2008), y en estudios con MetR al 40% (Sanchez-Roman y Barja, 2013a), debido a que el complejo I dirige su producción de ROS hacia la matriz mitocondrial, donde se encuentra el ADN mitocondrial, muy cercano o incluso en contacto con la membrana mitocondrial interna (Costa et al., 2011). Sin embargo el tratamiento con atenolol no disminuyó el daño al ADN mitocondrial, al contrario de lo sucedido en trabajos anteriores y el Objetivo 2 de esta tesis, donde el atenolol logró disminuir el daño al ADN mitocondrial incluso aumentando la producción mitocondrial de ROS (Sanchez-Roman et al., 2013), o sin producir cambios en la misma (Objetivo 2). Si bien

debemos tener en cuenta que el órgano objeto de estudio en ambos experimentos fue el corazón, que como se ha explicado anteriormente es el órgano diana del fármaco.

En cuanto a la señalización celular mediada por los tratamientos utilizados, en este caso vemos que la cantidad de proteína ERK fosforilada (pERK) no aumentó en los animales tratados con atenolol, a diferencia de lo ocurrido en los objetivos 1 y 2, y en trabajos anteriores (Sanchez-Roman et al., 2010; Sanchez-Roman et al., 2013). Todo parece apuntar nuevamente a que estas diferencias se deben al órgano elegido en el diseño experimental, ya que todos los estudios anteriores han sido llevados a cabo en corazón o músculo esquelético donde encontramos una gran cantidad de receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos, no como en el presente objetivo en el que todos los parámetros fueron medidos en hígado. Sin embargo, la MetR tanto en solitario como acompañada por atenolol, logró aumentar significativamente los niveles de p-ERK con respecto a los grupos control y atenolol. Estos resultados se ven apoyados por trabajos anteriores realizados en hepatocitos en cultivo, que al ser sometidos a MetR *in vitro* presentaron un aumento de la proteína de señalización p-ERK (Tsai et al., 2010), sugiriendo que la sobre-expresión del gen que codifica para la enzima glutathione-S-transferasa clase  $\pi$  observado durante la MetR está regulada a través de la vía ERK-Nrf2-GPEI (Lin et al., 2012). Además en otro trabajo llevado a cabo en cerebro de rata se demostró que la DR era capaz de revertir el descenso inducido por la edad en la cantidad de p-ERK (Zhen et al., 1999).

Aunque en un principio se pensó que los mecanismos que controlan la longevidad a través de la vía de señalización Raf/MEK/ERK (como en el caso del ratón AC5KO y el tratamiento con atenolol) eran independientes de los mecanismos por los que actúan las manipulaciones dietéticas descritas anteriormente (DR, PR y MetR), relacionadas sobre todo con las vías de señalización mediadas por mTOR y sirtuinas, estudios recientes han demostrado que la interacción de estos dos tipos de manipulaciones es letal, causando la muerte en un periodo inferior a un mes en ratones AC5KO sometidos a DR (Yan et al., 2012). Comparando estos dos modelos de ratones longevos (AC5KO y DR) en cuanto a su fenotipo y a los perfiles de expresión metabólica y genética; se han encontrado numerosas similitudes, llegando a la conclusión de que ambas manipulaciones extienden la longevidad a través de

mecanismos similares (Yan et al., 2012; Vatner et al., 2013). Además se ha visto que la vía Raf/MEK/ERK interacciona con la vía PI3K/PTEN/Akt/mTOR para regular la acción de mTOR y así controlar procesos de autofagia en respuesta a daño en el ADN, senescencia celular y envejecimiento (revisado en Steelman et al., 2011). También existen trabajos recientes que proponen la idea de un control del estrés oxidativo a través de la señalización adrenérgica mediado por la proteína SIRT1, de modo que una estimulación  $\beta$ -adrenérgica inhibiría la inducción del gen Sirt1 antagonizando los efectos beneficiosos sobre la longevidad mediados por AKT (Corbi et al., 2013). Estos nuevos descubrimientos podrían explicar porque en nuestro modelo la interacción del tratamiento con atenolol y la MetR no resultó beneficiosa, aunque tampoco letal, teniendo en cuenta que la MetR al 40% no tiene un efecto tan marcado sobre los parámetros relacionados con la longevidad como la DR. Por otro lado y como se ha mencionado anteriormente, el hígado no es el órgano diana del atenolol, por ello el efecto también fue más leve o casi inexistente. Sin embargo en estudios llevados a cabo con MetR y atenolol en corazón, vemos que en algunos casos la interacción de ambos puede resultar beneficiosa y sus efectos incluso aditivos, como en los parámetros relacionados con el grado de insaturación de ácidos grasos y el daño oxidativo a proteínas (Sanchez-Roman et al., 2013). Este hecho se podría explicar debido a la atenuación de los efectos de ambos procedimientos experimentales, que en el caso del atenolol son más suaves que en los ratones AC5KO (Yan et al., 2007), no bloqueando por completo la vía de señalización Raf/MEK/ERK; y en el caso de la MetR, su impacto sobre la longevidad máxima (18% de incremento) no es tan marcado como en el caso de la DR (40% de incremento de la longevidad máxima), lo que sugiere que los mecanismos por los que actúa no son tan potentes, o incluso que actúa solo en parte sobre las vías de señalización de la DR, por eso su mediación en la vía PI3K/PTEN/Akt/mTOR, conectada con la vía Raf/MEK/ERK sería menor que en el caso de la DR y no resultaría tan letal como en el caso de los ratones AC5KO sometidos a DR (Yan et al., 2012).

## 2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATONES ELOVL2 KO

Como se ha detallado a lo largo de esta tesis, el bajo grado de insaturación de las membranas está relacionado con el daño oxidativo que sufren las mismas, de modo que la sensibilidad a este daño oxidativo descenderá a medida que desciende el número de dobles enlaces dentro de cada molécula de ácido graso (Holman, 1954; Pratt et al., 2011). Este bajo grado de insaturación que confiere resistencia a las membranas correlaciona positivamente con la longevidad en las diferentes especies estudiadas (Naudi et al., 2013b).

Tras aproximaciones farmacológicas (atenolol) y dietéticas (MetR) para incidir sobre los factores que correlacionan en el sentido adecuado con la longevidad (baja producción mitocondrial de ROS y bajo grado de insaturación de los ácidos grasos), **en la presente tesis doctoral se estudió también el efecto de una manipulación genética: la ausencia del gen Elov12**. Nos centramos sobre todo en el estudio del segundo parámetro relevante en la longevidad: el grado de insaturación de los ácidos grasos, dado que el gen Elov12 codifica para la enzima elongasa 2 que es crucial en la biosíntesis de PUFAs. Además se estudió detalladamente la función mitocondrial de estos ratones, ya que es sabido que la composición lipídica de la membrana mitocondrial puede alterar el funcionamiento adecuado de la mitocondria afectando al transporte electrónico a través de la cadena y a la síntesis de ATP (Robblee y Clandinin, 1984; Lenton et al., 1995; Stanley et al., 2012).

El proceso de elongación/desaturación de los ácidos grasos mantiene la homeostásis lipídica y confiere funciones específicas a cada molécula dependiendo de la longitud y el grado de insaturación de la misma. Las enzimas elongasas catalizan la reacción inicial y limitante de condensación en la elongación de los PUFA. Hasta la fecha se han descrito 7 enzimas ELOVL. Nuestro estudio se centra en la ELOVL2, que se expresa preferentemente en hígado y testículos (Tvrdik et al., 2000). Previamente se ha estudiado la función *in vivo* de esta enzima mediante la generación de un ratón Elov12<sup>-/-</sup> KO, que demostró la relevancia de esta enzima en la espermatogénesis y la fertilidad (Zdravcevec et al., 2011). El presente estudio se centra en hígado, ya que es el

otro órgano dónde la expresión de la enzima es mayor y es uno de los principales órganos elegidos en estudios mitocondriales y de longevidad.

De este modo, la ausencia del gen *Elovl2* provocó una redistribución de los ácidos grasos que componen la membrana de las mitocondrias de hígado, de modo que los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup> mostraron un fuerte descenso de los PUFA n-3 y n-6 totales (35,1% y 15,79% respectivamente), así como un incremento de los MUFA totales del 33.5%. Esto se tradujo, entre otras cosas en un descenso significativo en la longitud media de la cadena (ACL) del 0,72%.

Estas diferencias en el perfil lipídico en los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup>, se pueden explicar por la ausencia de la enzima ELOVL2. Esta enzima es selectiva para PUFAs (Tvrdik et al., 2000), y utiliza los ácidos grasos 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:5n-3 como sustratos para obtener como productos los ácidos grasos 24:4n-6 y 24:5n-3, que son precursores de los ácidos grasos de cadena muy larga 22:5n-6 y 22:6n-3, por la acción de la desaturasa  $\Delta 6$  antes de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica. Sin embargo la composición de los ácidos grasos en estos ratones puede verse afectada no solo por la ausencia de la enzima ELOVL2, sino también por la incorporación de ácidos grasos de la dieta y por mecanismos compensatorios como una mayor actividad de la ELOVL5 en los puntos donde intervienen ambas enzimas (ELOVL 2 y 5). Este hecho puede explicar porque algunos sustratos de la ELOVL2 no se vieron incrementados en los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup>, a pesar de la falta de esta enzima. Este es el caso del descenso observado en los ácidos grasos linoleico (18:2n-6), que puede venir de la dieta y también ser sustrato de la enzima ELOVL5, y araquidónico (20:4n-6), también sujeto a la acción de la ELOVL5 como se muestra en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga y muy larga (Figura 9 de la Introducción). De todas formas, el producto final de esta ruta, el ácido graso 22:5n-6, disminuyó significativamente en los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup> (34,5% de descenso total), mostrando el efecto de la ausencia de la enzima ELOVL2.

En cuanto a la familia n-3, ambos sustratos de la enzima ELOVL2, el ácido eicosapentaenoico (22:5n-3) y el docosapentaenoico (22:5n-3) fueron más altos en los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup> de lo que cabría esperar, lo que explica que el producto final, el ácido docosahexaenoico (22:6n-3), descendiera extremadamente (88,42% de

descenso), mucho más que el producto final de la ruta de síntesis de la familia n-6. Este marcado descenso podría ser relevante, además de por el ya mencionado papel de los PUFAs en la resistencia de las membranas frente al estrés oxidativo, por el papel que desempeñan, en especial el ácido docosahexaenoico, en el control del metabolismo lipídico en el hígado. Así el ácido 22:6n-3 promovería la supresión del factor de transcripción SRBEP-1, que se traduciría en una inhibición de la lipogénesis lo que por una regulación en “*feedback*” provocaría cambios en el perfil lipídico (Jump et al., 2008). Al tener menos cantidad de 22:6n-3, SRBEP-1 no se encontraría tan inhibido y la lipogénesis se mantendría más activa. A su vez, la estimación de la actividad de las enzimas desaturasas y elongasas también revela la ausencia de la enzima ELOVL2, ya que por ejemplo la actividad C22:4/C20:4 es mayor en los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup> porque el ácido graso 20:4 es consumido por la enzima ELOVL5 mientras que el 22:4 se acumula por la ausencia de la ELOVL2. Como es de esperar, las actividades finales C24:5/C22:5 y C22:6/C24:6, relacionadas directamente con la actividad ELOVL2 y la  $\beta$ -peroxidación, disminuyeron significativamente en el ratón KO.

Para saber si estos cambios en el perfil lipídico de los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup> podrían afectar de alguna manera a la mitocondria, decidimos estudiar la función mitocondrial en estos ratones y en sus respectivos controles “*wild type*” (WT). Para ello medimos el consumo de oxígeno bajo diferentes estados metabólicos en presencia del sustrato del complejo I Glutamao/Malato. Tras el sustrato, se añadió ADP para evaluar la capacidad de fosforilación oxidativa (capacidad OXPHOS), seguido de oligomicina para estimar la fuga de protones y el potencial de membrana al inhibir la ATP sintasa, y finalmente el agente desacoplante de la fosforilación oxidativa FCCP para medir la capacidad respiratoria a través del sistema de transferencia de electrones y obtener un estado de referencia con bajo potencial de membrana. La composición lipídica puede alterar el potencial de membrana, cuya estimación máxima puede considerarse como una determinación del estado de fuga de protones (*proton leak*) (Gnaiger, 2009). La respiración tras añadir el sustrato, así como la insensibilidad a oligomicina (limitada por el potencial de membrana), tendió a aumentar en los ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup>, mientras que tras la estimulación con ADP y la adición de FCCP el consumo de oxígeno disminuyó en las mitocondrias de ratones *Elovl2*<sup>-/-</sup>. Estos cambios en direcciones



opuestas indican una eficiencia menor de la respiración mitocondrial, que se puso de manifiesto tras el cálculo del RCR (*Respiratory Control Ratio*), que fue significativamente menor (54.72% de descenso) en los ratones KO.

El descenso observado en los SFA, PUFA y el grado de insaturación total de los ácidos grasos, así como el aumento de los MUFA pueden afectar al contenido de fosfolípidos disminuyendo la fluidez de la membrana (Roach et al., 2004) y el potencial de membrana (estimado como fuga de protones), que podría disminuir el RCR en los ratones Elov12KO. Este bajo RCR indica un menor acoplamiento y menor eficiencia de la fosforilación en las mitocondrias de estos ratones, relacionado directamente con la composición lipídica de la membrana mitocondrial. Lo contrario ocurrió en un estudio en el que se incrementó un 30% el contenido lipídico de la dieta, incrementando así el DBI y el contenido de SFA y PUFA y disminuyendo el de MUFA, obteniendo como resultado un mayor RCR (Aoun et al., 2012). En vista a estos datos y a nuestros resultados, podríamos afirmar que un descenso en el contenido de ácidos grasos insaturados en la membrana mitocondrial conduce a un descenso en el RCR. Tiempo atrás, se publicaron más evidencias de deficiencias en la función mitocondrial (atenuación de la respiración y pérdida de la sensibilidad a oligomicina de la ATP-asa) debidas a cambios en la composición de fosfolípidos en la membrana mitocondrial. La infección de hígado con *F. Hepatica* disminuyó los niveles de ácidos grasos no esterificados debido a la hidrólisis de fosfolípidos de fosfstidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) (Lenton et al., 1995), dando lugar a la anteriormente mencionada pérdida en la función mitocondrial.

Además, nuestros resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Yamaoka y colaboradores tras realizar experimentos con manipulaciones dietéticas alimentando a las ratas con aceite de sardina. Ellos observaron cambios en la composición de ácidos grasos en PC y PE (una disminución del 18:2n-6 y un aumento de los ácidos grasos 18:1n-7 y 22:6n-3) relacionados con un descenso del consumo de oxígeno mitocondrial en estado 3 y 4. Los autores explican este hecho por medio de una disminución de la actividad citocromo c oxidasa y de la ATP-sintasa (ambas dependientes de la cardiolipina para su actividad) debido al reemplazo del ácido graso 18:2n-6 por el 20:6n-3 en la molécula de cardiolipina, que afecta drásticamente la actividad de las

enzimas mitocondriales. Concluyen que un descenso en los niveles de los ácidos grasos 18:2n-6 y 20:4n-6 (lo mismo que ocurre en nuestro modelo Elov12KO) en los fosfolípidos mitocondriales conduce a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Yamaoka et al., 1988). Aunque ellos no observaron cambios en el RCR, como en nuestro estudio, suponemos que cambios similares en la composición de ácidos grasos en nuestro modelo podría implicar una función mitocondrial deteriorada aunque en diferente sentido. Además se sabe que el alto contenido en ácidos grasos saturados en cardiolipina está inversamente relacionado con la fuga de protones y por lo tanto con el potencial de membrana, de manera que niveles más bajos de 18:2n-6 y mayores de MUFA pueden incrementar el estado 4, y con ello el potencial de membrana, al contrario de lo que sucede en nuestro trabajo (Hoch, 1992).

Abordando otras cuestiones, sabemos que trabajos recientes ponen en evidencia la organización de los complejos mitocondriales en supercomplejos. Esta asociación depende estrechamente de la cantidad y la composición de los lípidos de las membranas, así como de la peroxidación lipídica de las mismas. La asociación de los complejos en supercomplejos, confiere a los mismos nuevas propiedades, como canales de sustratos y cambios conformacionales que pueden variar la actividad respecto a los complejos individuales (Lenaz y Genova, 2012b). Además estos supercomplejos se desestabilizan cuando la cardiolipina sufre alteraciones en la membrana interna mitocondrial (McKenzie et al., 2006). Todo esto indica que cambios en las proteínas mitocondriales, en especial en los componentes de la cadena respiratoria, podrían estar relacionados con cambios en el perfil lipídico y provocar una función mitocondrial deficiente. Sin embargo en nuestro caso no observamos diferencias en la cantidad de los complejos de la cadena de transporte electrónico ni en la cantidad de la proteína mitoNEET (*Mitochondrial Outer membrane Protein*), que podría indicar la integridad de la membrana mitocondrial, además de que se ha demostrado que su ausencia en ratones conduce a una capacidad de fosforilación oxidativa reducida en la mitocondria (Wiley et al., 2007). Aunque no se observaron cambios en la cantidad de proteínas, la remodelación de los ácidos grasos de la membrana mitocondrial podría afectar a la actividad y función de los complejos mediante cambios conformacionales que afectarían a los centros catalíticos de dichos

complejos mitocondriales y disminuir su actividad (Schlame, 2013). La redistribución de los ácidos grasos puede causar variaciones en la cadena respiratoria afectando directamente a la función enzimática, la estabilidad de los complejos o puede desestabilizar los supercomplejos (McKenzie et al., 2006) independientemente de la cantidad de proteína.

Por otro lado, sabemos que el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas guarda una estrecha relación con el daño oxidativo, haciendo a las membranas más resistentes al mismo y condicionando la producción de radicales secundarios que pueden dañar a otras macromoléculas (Pamplona, 2008). Tras estudiar los índices relacionados con este parámetro, encontramos un fuerte descenso significativo en el DBI (17,01% de descenso) y en el PI (31,57% de descenso) en los ratones Elov12KO. Estos cambios se deben principalmente al fuerte descenso en el ácido araquidónico y docosahexaenoico, del mismo modo que ocurre en las especies longevas (Pamplona et al., 2002c). Pero quizá en este caso, el marcado descenso en el ácido docosahexaenoico (88,42% respecto a los ratones WT), aunque pueda resultar favorable en cuanto a la disminución del daño causado por estrés oxidativo, puede resultar excesivo e interferir con el desarrollo adecuado de la función mitocondrial, disminuyendo demasiado el potencial de membrana lo que conduciría al descenso en el RCR que encontramos en los ratones Elov12KO. Si comparamos, por ejemplo, con los ratones tratados con atenolol durante dos semanas (Sanchez-Roman et al., 2010), encontramos que el descenso del DBI fue alto (30% con respecto a los ratones control) sin embargo el ácido docosahexaenoico solamente disminuyó un 45,17%. En los ratones tratados a largo plazo con atenolol (Objetivo 2 de la presente tesis) encontramos que el descenso en el DBI fue de un 11% en corazón y un 22,35% en músculo, mientras que en ácido graso 22:6n-3 disminuyó un 23,08% y un 38,24% respectivamente. Por este motivo no se observaron cambios en el RCR ni en el consumo de oxígeno mitocondrial en los animales tratados con atenolol y si en los ratones Elov12KO. Así podemos deducir que un descenso moderado del ácido graso altamente insaturado 22:6n-3 es beneficioso para el organismo mejorando muchos parámetros relacionados con el envejecimiento y el estrés oxidativo, como se explicó

en el apartado anterior de esta discusión, mientras que un descenso muy marcado podría ser dañino e interferir, entre otras cosas, con la correcta función mitocondrial.

Resulta también interesante que el ácido graso que se encuentra incrementado en los mamíferos más longevos es el linoleico, sin embargo en el caso de las especies longevas de aves, suele encontrarse un incremento del ácido monoinsaturado oleico (Pamplona et al., 1996a), que además aporta múltiples beneficios nutricionales. Este ácido graso aumenta también en los ratones Elov12KO de nuestro estudio.

Tanto un bajo PI como un bajo DBI confieren a las membranas una mayor resistencia frente a la peroxidación lipídica y disminuyen el daño lipoxidativo a otras macromoléculas, como las proteínas. La oxidación de PUFAs puede contribuir a la generación de carbonilos por la interacción de productos derivados de la oxidación de lípidos con residuos de lisina y con radicales alcoxil obtenidos por la escisión de los hidroperóxidos en presencia de Fe(II) (Refsgaard et al., 2000). Estos productos primarios de la peroxidación lipídica pueden causar daño oxidativo a las proteínas como ocurre bajo condiciones de estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedades relacionadas con el mismo (Pamplona y Barja, 2011).

Por este motivo, decidimos medir algunos marcadores de daño oxidativo a proteínas. Mientras que los marcadores específicos de glicoxidación y los carbonilos específicos GSA y AASA no mostraron diferencias significativas, el marcador específico de lipoxidación proteica MDAL disminuyó significativamente (27,56%) en los ratones Elov12KO, como consecuencia del fuerte descenso del ácido docosahexaenoico y el aumento en el oleico. La peroxidación oxidativa del ácido graso 22:6n-3 en los fosfolípidos de membrana puede inducir también la formación de productos tóxicos de bajo peso molecular con propiedades mutagénicas y aterogénicas (Polidori et al., 2007).

Como se ha reiterado anteriormente en esta tesis, los niveles de peroxidación lipídica aumentan con la edad (Spiteller, 2001) debido a cambios físico-químicos y fisiológicos en las membranas, aumentando el DBI y PI así como la peroxidación lipídica *in vivo* e *in vitro* (Pamplona, 2008) y sabemos que existe una correlación negativa entre la longevidad y el grado de insaturación de las membranas en todos las

especies de mamíferos (Pamplona et al., 2002; Hulbert et al., 2007) y aves (Mitchell et al., 2007) estudiadas.

Aunque hasta la fecha no existen implicaciones previas de la enzima ELOVL2 en el proceso de envejecimiento, todas las evidencias puestas de manifiesto en nuestro estudio (bajos niveles de DBI, PI y MDAL) nos llevan a pensar en una posible relación entre ELOVL2 y longevidad. Solamente un estudio ha relacionado, de alguna manera, esta enzima con el envejecimiento, mostrando una correlación entre la metilación del gen *Elovl2* con la edad en humanos, de manera que la metilación de este gen aumentaría con la edad (Garagnani et al., 2012). Aún así no podemos concluir de qué modo afecta esta metilación a la expresión de la enzima, ya que es solo una correlación, sin implicaciones funcionales, además de que el efecto de la metilación del ADN sobre el envejecimiento no es muy claro, ya que depende de que regiones del gen estén metiladas (Bjornsson et al., 2007). Por lo tanto los datos de este estudio no nos aclaran si al metilarse el gen *Elovl2* tendríamos una mayor o menor expresión de la enzima con la edad.

A pesar de la aparente contradicción entre la resistencia que presentan las membranas frente al estrés oxidativo y la baja eficiencia en la respiración mitocondrial de los ratones *Elovl2*KO, recientemente se ha publicado un trabajo que muestra un incremento de la longevidad en el nematodo *C. elegans* a pesar de tener una disminución en la respiración mitocondrial. Todo esto se consiguió gracias a la supresión del gen que codifica para la proteína ribosómica mitocondrial S5 (*Mrps5*). En estos gusanos, la respiración basal se encontró disminuida y sus mitocondrias no mostraron respuesta a FCCP. Como consecuencia se encontraron niveles reducidos de ATP y una menor actividad citrato sintasa, indicando una menor actividad o abundancia mitocondrial (Houtkooper et al., 2013). La posible explicación, propuesta por los autores, es por medio de la respuesta de plegamiento de las proteínas mitocondriales (Durieux et al., 2011), que puede causar un desequilibrio entre las proteínas codificadas por ADN nuclear o mitocondrial interfiriendo con las rutas de señalización mitocondriales relacionadas con la longevidad. Por ejemplo en el caso del complejo II, que es codificado totalmente por ADN nuclear, puede ser prescindible en la generación mitocondrial de ATP además de no formar parte de los supercomplejos

(Schulz et al., 2007), por lo que su presencia o funcionalidad podría no ser tan determinante en el funcionamiento correcto de otros aspectos mitocondriales a parte de la respiración. Así surgirían nuevos modelos de longevidad, que a diferencia de otros establecidos hasta la fecha que incrementan la respiración mitocondrial (rapamicina), podrían disminuirla y aumentar igualmente la longevidad (Houtkooper et al., 2013). Aunque serían necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis, en base a nuestros datos (bajo PI y disminución del estrés oxidativo) podemos sugerir que el descenso en la respiración mitocondrial en nuestro modelo *Elovl2KO* podría ser el resultado de una adaptación que probablemente induciría resistencia bajo ciertas condiciones resultando una ventaja para el aumento de la longevidad. En la misma línea que nuestro estudio, se ha publicado recientemente un trabajo en el que mediante la inhibición de la desaturasa  $\Delta 6$  en ratones C57BL/6 se consigue una remodelación de los ácidos grasos que componen la cardiolipina, de manera que se produce un aumento del ácido linoleico y un descenso de los ácidos grasos araquidónico y docosahexaenoico, disminuyendo de este modo el PI, de forma similar al o que ocurre en nuestros ratones *Elovl2KO*. Aunque no se observaron cambios en la función mitocondrial, si se detectó una remodelación y mejora de la función cardíaca, previniendo la disfunción contráctil en el corazón de los ratones viejos que tenían la enzima desaturasa  $\Delta 6$  inhibida, directamente relacionado con los cambios descritos en el perfil lipídico (Mulligan et al., 2014). Esta restauración de la función cardíaca perdida con la edad, indicaría una mejora en parámetros relacionados con el envejecimiento debida a una modificación en la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos que disminuiría el grado de insaturación de los mismos, y sería independiente de la función mitocondrial, al igual que en el caso del objetivo 4 de esta tesis doctoral.



## CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS





- ◆ El tratamiento con atenolol a corto plazo en animales genéticamente heterogéneos (rata Wistar) disminuye el índice de insaturación de los ácidos grasos de las membranas mitocondriales de corazón, mostrando un menor PI derivado sobre todo de un marcado descenso del ácido graso 22:6n-3; esto propicia un descenso del daño lipoxidativo a proteínas estimado a través del marcador MDAL. Por el contrario el atenolol a corto plazo no es capaz de modificar la producción mitocondrial de radicales libres ni al daño oxidativo al ADN mitocondrial.
- ◆ El tratamiento con atenolol a largo plazo (16 meses), disminuye la cantidad de grasa corporal, el DBI y el PI en ratones viejos (18 meses de edad) hasta valores similares a los de ratones jóvenes control, al igual que ocurre con todos los marcadores de daño oxidativo a proteínas tanto en corazón como en músculo esquelético. Además se observan mejoras en el sistema inmune y en parámetros comportamentales, así como un descenso en el daño oxidativo al ADN mitocondrial en corazón, y un aumento de la cantidad de proteína p-ERK en ambos órganos.
- ◆ El tratamiento con atenolol durante todo el ciclo vital, disminuye la presión sanguínea y sobre todo la frecuencia cardiaca en ratones muy viejos (35 meses de edad), lo que coincide con un aumento significativo de la mortalidad en esta ventana temporal.
- ◆ A pesar de los notables efectos beneficiosos sobre numerosos parámetros relacionados con el envejecimiento, el tratamiento con atenolol durante todo el ciclo vital no es capaz de aumentar la longevidad media ni la longevidad máxima, lo que probablemente se deba a efectos secundarios del fármaco como por ejemplo el marcado descenso en la frecuencia cardiaca a edades avanzadas, o a la necesidad de variar simultáneamente otros mecanismos implicados en la regulación de la longevidad.
- ◆ El tratamiento combinado de restricción de metionina en la dieta y atenolol en el agua de bebida no disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas en mitocondrias de hígado. El único efecto observado en este experimento es debido a la restricción de metionina, que disminuye la producción mitocondrial de ROS en el complejo I, el daño oxidativo al ADN mitocondrial y los marcadores de daño oxidativo a proteínas, al igual que en trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio.
- ◆ La cantidad de proteína p-ERK no aumenta en hígado tras el tratamiento con atenolol, lo que junto a los demás resultados sugiere que el atenolol actúa de

manera específica sobre sus órganos diana (corazón y músculo esquelético), que presentan gran cantidad de receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos, sin embargo sus efectos en otros tejidos como el hígado son prácticamente inexistentes.

- ◆ La ausencia del gen *Elovl2*, produce una redistribución del perfil lipídico en mitocondrias de hígado de ratón, disminuyendo el DBI y el PI debido sobre todo a un fuerte descenso en los ácidos grasos araquidónico y docosahexaenoico y a un aumento en el ácido oleico, reduciendo el daño lipoxidativo a proteínas. Por otro lado las mitocondrias de hígado de estos ratones *Elovl2*KO presentan un menor RCR (ratio ADP/oligomicina).
- ◆ Los trabajos realizados en esta tesis indican que uno de los dos factores que correlaciona con la longevidad en aves y mamíferos: el bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas, puede conseguirse mediante el tratamiento con atenolol en diferentes especies y con distinta duración del mismo, y también mediante el bloqueo genético de la ruta de elongación de los ácidos grasos. Tal descenso se asocia con mejoras a nivel de sistema inmunitario, comportamental y con el estrés oxidativo.

## CONCLUSIONS

- ◆ Short term atenolol treatment decreases heart mitochondrial membrane fatty acid unsaturation degree and lipoxidative damage to proteins by a strong decrease of the highly unsaturated fatty acid 22:6n-3 in genetically heterogeneous animals like Wistar rat heart at the same way as in C57BL/6 mice. Short term atenolol treatment in contrast it does not modify mitochondrial ROS production neither oxidative damage to mitochondrial DNA.
- ◆ Long term atenolol treatment (16 months) decreases fat amount, DBI, PI and oxidative damage markers to proteins in B6D2F1 mice heart and skeletal muscle. Improvements in immune system and behavior parameters was also seen, as well as a decrease in oxidative damage to mitochondrial DNA in heart and a higher amount of p-ERK protein in both tissues.
- ◆ Atenolol treatment during the whole life decreases blood pressure and mainly heart rate in very old mice (35 months old), the same time period in which a significant increase in mortality was observed.
- ◆ In spite of these positive changes, mean and maximum life span does not increase after atenolol treatment, probably due to drug secondary effects like an increase in heart rate in very old animals. Different reasons could be implicated, like the requirement of change at the same time other parameters linked with longevity regulation.
- ◆ Simultaneous treatment with methionine restriction and atenolol does not decrease membrane fatty acid unsaturation degree in Wistar rat liver. The only observed effect is due to dietary methionine restriction, which decreases mitochondrial ROS production at complex I, oxidative damage to mitochondrial DNA and protein oxidation markers, in agreement with previous works in different tissues.
- ◆ p-ERK protein amount does not increase after atenolol treatment in liver, suggesting joint to the rest of results that atenolol acts specifically on its target tissues (heart and skeletal muscle) which exhibit plenty of  $\beta$ -1 adrenergic receptors, while they are less present in other tissues like liver.

- ◆ The lack of the Elov12 gen lead to a lipid profile redistribution in 127sv mice liver, decreasing DBI and PI by the arachidonic and docosahexaenoic fatty acids strong decrease and the oleic acid increase. These changes cause a decrease in lipoxidative damage to proteins. On the other hand, Elov12KO liver mitochondria show a low RCR (ADP/oligomycin ratio).
- ◆ Different work made in this thesis indicate that one of the factors who correlates with longevity in birds and mammals (the low membrane fatty acid unsaturation degree) can be get by atenolol treatment in different species and under different time periods, and can be also get by the genetic blocking of the fatty acid elongation pathway. This decrease in membrane fatty acid unsaturation is associated with improvements in immune system, behavior and oxidative stress.

## BIBLIOGRAFÍA



- Al-Gubory, K.H., 2012. Mitochondria: omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species. *Int J Biochem Cell Biol.* 44, 1569-1573.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., Enriquez, J.A., 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell.* 32, 529-539.
- Ahmed, M.U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., 1997. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J.* 324 ( Pt 2), 565-570.
- Ahuja, N., Schwer, B., Carobbio, S., Waltregny, D., North, B.J., Castronovo, V., et al., 2007. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.* 282, 33583-33592.
- Al-Tubuly, R., Aburawi, S., Alghzewi, E., Gorash, Z., Errwami, S., 2008. The effect of sympathetic antagonists on the antidepressant action of alprazolam. *Libyan J Med.* 3, 78-83.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., et al., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290, 457-465.
- Andersson, D.C., Fauconnier, J., Yamada, T., Lacampagne, A., Zhang, S.J., Katz, A., et al., 2011. Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the beta-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J Physiol.* 589, 1791-1801.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., et al., 2011. If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging (Albany NY).* 3, 148-157.
- Anisimov, V.N., Semchenko, A.V., Yashin, A.I., 2003. Insulin and longevity: antidiabetic biguanides as geroprotectors. *Biogerontology.* 4, 297-307.
- Aoun, M., Feillet-Coudray, C., Fouret, G., Chabi, B., Crouzier, D., Ferreri, C., et al., 2012. Rat liver mitochondrial membrane characteristics and mitochondrial functions are more profoundly altered by dietary lipid quantity than by dietary lipid quality: effect of different nutritional lipid patterns. *Br J Nutr.* 107, 647-659.
- Asuncion, J.G., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F.V., et al., 1996. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* 10, 333-338.
- Azzu, V., Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Brand, M.D., 2010. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1797, 785-791.
- Baek, I.H., Yun, M.H., Yun, H.Y., Kwon, K.I., 2008. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the cardiovascular effects of beta blockers in humans. *Arch Pharm Res.* 31, 814-821.
- Baeza, I., De Castro, N.M., Gimenez-Llort, L., De la Fuente, M., 2010. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol.* 219, 90-99.
- Bailey, C.J., Turner, R.C., 1996. Metformin. *N Engl J Med.* 334, 574-579.
- Bangalore, S., Messerli, F.H., Cohen, J.D., Bacher, P.H., Sleight, P., Mancia, G., et al., 2008a. Verapamil-sustained release-based treatment strategy is equivalent to atenolol-based treatment strategy at reducing cardiovascular events in patients with prior myocardial infarction: an International VERapamil SR-Trandolapril (INVEST) substudy. *Am Heart J.* 156, 241-247.
- Bangalore, S., Sawhney, S., Messerli, F.H., 2008b. Relation of beta-blocker-induced heart rate lowering and cardioprotection in hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 52, 1482-1489.
- Barciszewski, J., Barciszewska, M.Z., Siboska, G., Rattan, S.I., Clark, B.F., 1999. Some unusual nucleic acid bases are products of hydroxyl radical oxidation of DNA and RNA. *Mol Biol Rep.* 26, 231-238.
- Barja, G., 1993. Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Radic Res Commun.* 18, 63-70.



- Barja, G., 1999. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 31, 347-366.
- Barja, G., 2002. The quantitative measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 34, 227-233.
- Barja, G., 2004a. Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 27, 595-600.
- Barja, G., 2004b. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev Camb Philos Soc.* 79, 235-251.
- Barja, G., 2007. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res.* 10, 215-224.
- Barja, G., 2008. The gene cluster hypothesis of aging and longevity. *Biogerontology.* 9, 57-66.
- Barja, G., 2013. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid Redox Signal.* 19, 1420-1445.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., 1994b. A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol.* 108, 501-512.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., 1994a. Low mitochondrial free radical production per unit O<sub>2</sub> consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic Res.* 21, 317-327.
- Barja, G., Herrero, A., 1998. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr.* 30, 235-243.
- Barja, G., Herrero, A., 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 14, 312-318.
- Bartke, A., Coschigano, K., Kopchick, J., Chandrashekar, V., Mattison, J., Kinney, B., et al., 2001a. Genes that prolong life: relationships of growth hormone and growth to aging and life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 56, B340-349.
- Bass, T.M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D., Partridge, L., 2007. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* 128, 546-552.
- Bauer, J.H., Goupil, S., Garber, G.B., Helfand, S.L., 2004. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 12980-12985.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., et al., 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 444, 337-342.
- Bell, E.L., Guarente, L., 2011. The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Mol Cell.* 42, 561-568.
- Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., et al., 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet.* 38, 515-517.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Crofts, A.R., 2000. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem.* 69, 1005-1075.
- Berthonneche, C., Peter, B., Schupfer, F., Hayoz, P., Kutalik, Z., Abriel, H., et al., 2009. Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains. *PLoS One.* 4, e6610.
- Bielski, B.H., Arudi, R.L., Sutherland, M.W., 1983. A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 258, 4759-4761.
- Bjornsson, H.T., Brown, L.J., Fallin, M.D., Rongione, M.A., Bibikova, M., Wickham, E., et al., 2007. Epigenetic specificity of loss of imprinting of the IGF2 gene in Wilms tumors. *J Natl Cancer Inst.* 99, 1270-1273.

- Blanchard, J.L., Lynch, M., 2000. Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends Genet.* 16, 315-320.
- Boveris, A., Cadenas, E., Stoppani, A.O., 1976. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 156, 435-444.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134, 707-716.
- Boyden, S., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 115, 453-466.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Brand, M.D., Buckingham, J.A., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., et al., 2004. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem Soc Symp.* 203-213.
- Brandt, U., 1997. Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta.* 1318, 79-91.
- Brenner, R.R., 1984. Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Prog Lipid Res.* 23, 69-96.
- Brown-Borg, H.M., Borg, K.E., Meliska, C.J., Bartke, A., 1996. Dwarf mice and the ageing process. *Nature.* 384, 33.
- Burnett, C., Valentini, S., Cabreiro, F., Goss, M., Somogyvari, M., Piper, M.D., et al., 2011. Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature.* 477, 482-485.
- Cabreiro, F., Au, C., Leung, K.Y., Vergara-Irigaray, N., Cocheme, H.M., Noori, T., et al., 2013. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell.* 153, 228-239.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C.I., Stoppani, A.O., 1977. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 180, 248-257.
- Caro, P., Gomez, J., Arduini, A., Gonzalez-Sanchez, M., Gonzalez-Garcia, M., Borrás, C., et al., 2010. Mitochondrial DNA sequences are present inside nuclear DNA in rat tissues and increase with age. *Mitochondrion.* 10, 479-486.
- Caro, P., Gomez, J., Lopez-Torres, M., Sanchez, I., Naudi, A., Jove, M., et al., 2008a. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology.* 9, 183-196.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Garcia, R., Lopez-Torres, M., Naudi, A., et al., 2009b. Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology.* 10, 579-592.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Naudi, A., Ayala, V., López-Torres, M., et al., 2009. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuvenation Res.* 12, 421-434.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Naudi, A., Ayala, V., Lopez-Torres, M., et al., 2009a. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuvenation Res.* 12, 421-434.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2006. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem.* 281, 32724-32727.

- Cecchini, G., 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem.* 72, 77-109.
- Clason, T., Ruiz, T., Schagger, H., Peng, G., Zickermann, V., Brandt, U., et al., 2010. The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J Struct Biol.* 169, 81-88.
- Claypool, S.M., Oktay, Y., Boontheung, P., Loo, J.A., Koehler, C.M., 2008. Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol.* 182, 937-950.
- Cline, S.D., 2012. Mitochondrial DNA damage and its consequences for mitochondrial gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1819, 979-991.
- Cockcroft, J.R., Pedersen, M.E., 2012. beta-blockade: benefits beyond blood pressure reduction? *J Clin Hypertens (Greenwich).* 14, 112-120.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., et al., 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* 325, 201-204.
- Cooke, M.S., Podmore, I.D., Mistry, N., Evans, M.D., Herbert, K.E., Griffiths, H.R., et al., 2003. Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair. *J Immunol Methods.* 280, 125-133.
- Corbi, G., Conti, V., Russomanno, G., Longobardi, G., Furgi, G., Filippelli, A., et al., 2013. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Front Physiol.* 4, 324.
- Coschigano, K.T., Clemmons, D., Bellush, L.L., Kopchick, J.J., 2000. Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology.* 141, 2608-2613.
- Costa, R.A., Romagna, C.D., Pereira, J.L., Souza-Pinto, N.C., 2011. The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr.* 43, 25-29.
- Crofts, A.R., 2004. Proton-coupled electron transfer at the Qo-site of the bc1 complex controls the rate of ubihydroquinone oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1655, 77-92.
- Crott, J.W., Choi, S.W., Branda, R.F., Mason, J.B., 2005. Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue and folate-dependent in rats. *Mutat Res.* 570, 63-70.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59, 527-605.
- Cheng, X., Ivessa, A.S., 2010. The migration of mitochondrial DNA fragments to the nucleus affects the chronological aging process of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell.* 9, 919-923.
- Choi, G.J., Lee, H.J., Cho, K.Y., 1996. Lipid Peroxidation and Membrane Disruption by Vinclozolin in Dicarboximide-Susceptible and -Resistant Isolates of *Botrytis cinerea*. *Pestic Biochem Physiol.* 55, 29-39.
- Chouchani, E.T., Methner, C., Nadtochiy, S.M., Logan, A., Pell, V.R., Ding, S., et al., 2013. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med.* 19, 753-759.
- Dai, D.F., Chen, T., Johnson, S.C., Szeto, H., Rabinovitch, P.S., 2012. Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 16, 1492-1526.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 52, 601-623.
- Davies, K.J., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem.* 262, 9895-9901.
- Davies, M.J., 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 305, 761-770.
- de la Fuente, J., Maritz-Olivier, C., Naranjo, V., Ayoubi, P., Nijhof, A.M., Almazan, C., et al., 2008. Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC Genomics.* 9, 372.

- De la Fuente, M., 2008. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation*. 15, 213-223.
- De la Fuente, M., Baeza, I., Guayerbas, N., Puerto, M., Castillo, C., Salazar, V., et al., 2004. Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology*. 5, 389-400.
- De la Fuente, M., Medina, S., Baeza, I., Jimenez, L., Improvement of leucocyte functions in mature and old mice after 15 and 30 weeks of diet supplementation with polyphenol-rich biscuits. *Eur J Nutr*. 50, 563-573.
- Deary, I.J., Capewell, S., Hajducka, C., Muir, A.L., 1991. The effects of captopril vs atenolol on memory, information processing and mood: a double-blind crossover study. *Br J Clin Pharmacol*. 32, 347-353.
- Del Rio, M., De la Fuente, M., 1994. Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes. *Regul Pept*. 49, 185-193.
- Desai, V.G., Weindruch, R., Hart, R.W., Feuers, R.J., 1996. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys*. 333, 145-151.
- Dhahbi, J.M., Kim, H.J., Mote, P.L., Beaver, R.J., Spindler, S.R., 2004. Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 5524-5529.
- Dhahbi, J.M., Mote, P.L., Wingo, J., Rowley, B.C., Cao, S.X., Walford, R.L., et al., 2001. Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes. *Mech Ageing Dev*. 122, 1033-1048.
- Dizdaroglu, M., 1992. Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *Int J Radiat Biol*. 61, 175-183.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*. 46, 382-419.
- Dobrosotskaya, I.Y., Seegmiller, A.C., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Rawson, R.B., 2002. Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science*. 296, 879-883.
- Drose, S., Brandt, U., 2012. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*. 748, 145-169.
- Durieux, J., Wolff, S., Dillin, A., 2011. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*. 144, 79-91.
- Emeny, R.T., Gao, D., Lawrence, D.A., 2007. Beta1-adrenergic receptors on immune cells impair innate defenses against *Listeria*. *J Immunol*. 178, 4876-4884.
- Esterhazy, D., King, M.S., Yakovlev, G., Hirst, J., 2008. Production of reactive oxygen species by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Escherichia coli* and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry*. 47, 3964-3971.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S.D., Gendron, C.M., Longo, V.D., 2001. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*. 292, 288-290.
- Failla, G., 1958. The aging process and cancerogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 71, 1124-1140.
- Falkenberg, M., Larsson, N.G., Gustafsson, C.M., 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 76, 679-699.
- Fato, R., Bergamini, C., Bortolus, M., Maniero, A.L., Leoni, S., Ohnishi, T., et al., 2009. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 1787, 384-392.
- Ferrandez, M.D., De la Fuente, M., 1999. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand*. 166, 47-53.
- Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R.A., Harrison, D.E., 2001. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 6736-6741.

- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H., 1975. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Fontana, L., Klein, S., Holloszy, J.O., 2010. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)*. 32, 97-108.
- Funovic, P., Korda, M., Kubant, R., Barlag, R.E., Jacob, R.F., Mason, R.P., et al., 2008. Effect of beta-blockers on endothelial function during biological aging: a nanotechnological approach. *J Cardiovasc Pharmacol*. 51, 208-215.
- Galkin, A., Brandt, U., 2005. Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem*. 280, 30129-30135.
- Galkin, A., Drose, S., Brandt, U., 2006. The proton pumping stoichiometry of purified mitochondrial complex I reconstituted into proteoliposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1757, 1575-1581.
- Gamliel, A., Afri, M., Frimer, A.A., 2008. Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps. *Free Radic Biol Med*. 44, 1394-1405.
- Garagnani, P., Bacalini, M.G., Pirazzini, C., Gori, D., Giuliani, C., Mari, D., et al., 2012. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell*. 11, 1132-1134.
- Gellissen, G., Bradfield, J.Y., White, B.N., Wyatt, G.R., 1983. Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of a locust. *Nature*. 301, 631-634.
- Gems, D., Partridge, L., 2001. Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr Opin Genet Dev*. 11, 287-292.
- Genova, M.L., Lenaz, G., 2013. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta*.
- Georgiadi, A., Kersten, S., 2012. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv Nutr*. 3, 127-134.
- Ghosh, P.M., Shu, Z.J., Zhu, B., Lu, Z., Ikeno, Y., Barnes, J.L., et al., 2012. Role of beta-adrenergic receptors in regulation of hepatic fat accumulation during aging. *J Endocrinol*. 213, 251-261.
- Gimenez-Llort, L., Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Fredholm, B.B., Tobena, A., Pekny, M., et al., 2002. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci*. 16, 547-550.
- Gnaiger, E., 2009. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol*. 41, 1837-1845.
- Gomez, J., Caro, P., Sanchez, I., Naudi, A., Jove, M., Portero-Otin, M., et al., 2009. Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. *J Bioenerg Biomembr*. 41, 309-321.
- Gonzalez-Covarrubias, V., Beekman, M., Uh, H.W., Dane, A., Troost, J., Paliukhovich, I., et al., 2013. Lipidomics of familial longevity. *Aging Cell*. 12, 426-434.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 177, 751-766.
- Gottle, M., Geduhn, J., Konig, B., Gille, A., Hoehlerl, K., Seifert, R., 2009. Characterization of mouse heart adenylyl cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*. 329, 1156-1165.
- Gottlieb, S.S., McCarter, R.J., Vogel, R.A., 1998. Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 339, 489-497.
- Gredilla, R., Barja, G., 2005. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology*. 146, 3713-3717.
- Gredilla, R., Barja, G., Lopez-Torres, M., 2001a. Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr*. 33, 279-287.

- Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M., Barja, G., 2001b. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* 15, 1589-1591.
- Grune, T., Klotz, L.O., Gieche, J., Rudeck, M., Sies, H., 2001. Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 30, 1243-1253.
- Guayerbas, N., Catalan, M., Victor, V.M., Miquel, J., De la Fuente, M., 2002a. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res.* 134, 41-48.
- Guayerbas, N., Puerto, M., Victor, V.M., Miquel, J., De la Fuente, M., 2002b. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol.* 37, 249-256.
- Guillou, H., Zdravce, D., Martin, P.G., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res.* 49, 186-199.
- Guo, Y.P., Liu, Y., Li, J.B., Huang, Y., Qi, H.P., Xie, J., et al., Chronic beta-adrenoceptor antagonists upregulate the rat alveolar macrophage adrenergic system through the beta1-subtype. *Cell Physiol Biochem.* 28, 315-322.
- Hagopian, K., Chen, Y., Simmons Domer, K., Soo Hoo, R., Bentley, T., McDonald, R.B., et al., 2011. Caloric restriction influences hydrogen peroxide generation in mitochondrial sub-populations from mouse liver. *J Bioenerg Biomembr.* 43, 227-236.
- Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97, 1634-1658.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219, 1-14.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11, 298-300.
- Harman, D., 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 20, 145-147.
- Harman, D., Free radical theory of aging: role of free radical reactions in the origination and evolution of life, aging and disease processes., Liss1986.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., et al., 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 460, 392-395.
- Hatch, G.M., 1998. Cardiolipin: biosynthesis, remodeling and trafficking in the heart and mammalian cells (Review). *Int J Mol Med.* 1, 33-41.
- Hayflick, L., 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res.* 37, 614-636.
- Herrero, A., Barja, G., 1997. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev.* 98, 95-111.
- Herrero, A., Barja, G., 1998. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mech Ageing Dev.* 103, 133-146.
- Herrero, A., Barja, G., 1999. 8-oxo-deoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Aging (Milano).* 11, 294-300.
- Herrero, A., Barja, G., 2000. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 32, 609-615.
- Herrero, A., Portero-Otin, M., Bellmunt, M.J., Pamplona, R., Barja, G., 2001. Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and lipid and protein oxidative damage. *Mech Ageing Dev.* 122, 427-443.

- Hidiroglou, N., Gilani, G.S., Long, L., Zhao, X., Madere, R., Cockell, K., et al., 2004. The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. *J Nutr Biochem.* 15, 730-740.
- Hinchliffe, P., Sazanov, L.A., 2005. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science.* 309, 771-774.
- Hirst, J., King, M.S., Pryde, K.R., 2008. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem Soc Trans.* 36, 976-980.
- Hock, M.B., Kralli, A., 2009. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol.* 71, 177-203.
- Hoch, F.L., 1992. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta.* 1113, 71-133.
- Hoch, F.L., 1998. Cardiolipins and mitochondrial proton-selective leakage. *J Bioenerg Biomembr.* 30, 511-532.
- Hoffman, D.L., Salter, J.D., Brookes, P.S., 2007. Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292, H101-108.
- Holman, R.T., Autoxidation of fats and related substances. In: R.T. Holman, W.O. Lundberg, T. Malkin, (Eds.), *Progress in chemistry of fats and other lipids*, Pergamon Press, London, 1954, pp. 51–98.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., et al., 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature.* 421, 182-187.
- Horakova, M., Deyl, Z., Hausmann, J., Macek, K., 1988. The effect of low protein-high dextrin diet and subsequent food restriction upon life prolongation in Fischer 344 male rats. *Mech Ageing Dev.* 45, 1-7.
- Houtkooper, R.H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moullan, N., Katsyuba, E., Knott, G., et al., 2013. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature.* 497, 451-457.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., et al., 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425, 191-196.
- Hulbert, A.J., Beard, L.A., Grigg, G.C., 2008. The exceptional longevity of an egg-laying mammal, the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*) is associated with peroxidation-resistant membrane composition. *Exp Gerontol.* 43, 729-733.
- Hulbert, A.J., Faulks, S.C., Buffenstein, R., 2006. Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 61, 1009-1018.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttemer, W.A., 2007. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev.* 87, 1175-1213.
- Hulbert, A.J., Rana, T., Couture, P., 2002. The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 132, 515-527.
- Hunte, C., Zickermann, V., Brandt, U., 2010. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science.* 329, 448-451.
- Hutter, D., Yo, Y., Chen, W., Liu, P., Holbrook, N.J., Roth, G.S., et al., 2000. Age-related decline in Ras/ERK mitogen-activated protein kinase cascade is linked to a reduced association between Shc and EGF receptor. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55, B125-134.
- Ikeyama, S., Kokkonen, G., Shack, S., Wang, X.T., Holbrook, N.J., 2002. Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *FASEB J.* 16, 114-116.
- Ishikawa, Y., Iwatsubo, K., Tsunematsu, T., Okumura, S., 2005. Genetic manipulation and functional analysis of cAMP signalling in cardiac muscle: implications for a new target of pharmacotherapy. *Biochem Soc Trans.* 33, 1337-1340.

- Ivanetich, K.M., Bradshaw, J.J., Ziman, M.R., 1996. Delta 6-desaturase: improved methodology and analysis of the kinetics in a multi-enzyme system. *Biochim Biophys Acta.* 1292, 120-132.
- James, A.M., Murphy, M.P., 2002. How mitochondrial damage affects cell function. *J Biomed Sci.* 9, 475-487.
- Jang, Y.C., Liu, Y., Hayworth, C.R., Bhattacharya, A., Lustgarten, M.S., Muller, F.L., et al., 2012. Dietary restriction attenuates age-associated muscle atrophy by lowering oxidative stress in mice even in complete absence of CuZnSOD. *Aging Cell.* 11, 770-782.
- Jiang, F., Ryan, M.T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., et al., 2000. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem.* 275, 22387-22394.
- Jin, W., 2010. Age-related increase of beta1-adrenergic receptor gene expression in rat liver: a potential mechanism contributing to increased beta-adrenergic receptor density and responsiveness during aging. *J Recept Signal Transduct Res.* 30, 24-30.
- Jobson, R.W., Nabholz, B., Galtier, N., 2010. An evolutionary genome scan for longevity-related natural selection in mammals. *Mol Biol Evol.* 27, 840-847.
- Jove, M., Naudi, A., Aledo, J.C., Cabre, R., Ayala, V., Portero-Otin, M., et al., 2013. Plasma long-chain free fatty acids predict mammalian longevity. *Sci Rep.* 3, 3346.
- Jump, D.B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Demeure, O., Christian, B., 2008. Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem Phys Lipids.* 153, 3-13.
- Juretic, N., 1995. Mitochondrial DNA rearrangements: intracellular information system. *FEBS Lett.* 362, 337-341.
- Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E.A., Caldwell, S.D., et al., 2005a. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem.* 280, 17038-17045.
- Kaeberlein, M., McVey, M., Guarente, L., 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13, 2570-2580.
- Kaeberlein, M., Powers, R.W., 3rd, Steffen, K.K., Westman, E.A., Hu, D., Dang, N., et al., 2005b. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science.* 310, 1193-1196.
- Kanfi, Y., Naiman, S., Amir, G., Peshti, V., Zinman, G., Nahum, L., et al., 2012. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature.* 483, 218-221.
- Kapahi, P., Chen, D., Rogers, A.N., Katewa, S.D., Li, P.W., Thomas, E.L., et al., 2010. With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab.* 11, 453-465.
- Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., Benzer, S., 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol.* 14, 885-890.
- Kastle, M., Grune, T., 2011. Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin proteasomal system. *Curr Pharm Des.* 17, 4007-4022.
- Khorakova, M., Deil, Z., Khausman, D., Matsek, K., 1990. [Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fischer 344 male rats]. *Fiziol Zh.* 36, 16-21.
- Knecht, K.J., Dunn, J.A., McFarland, K.F., McCance, D.R., Lyons, T.J., Thorpe, S.R., et al., 1991. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes.* 40, 190-196.
- Knight, J.A., 1995. The process and theories of aging. *Ann Clin Lab Sci.* 25, 1-12.
- Koh, C.H., Whiteman, M., Li, Q.X., Halliwell, B., Jenner, A.M., Wong, B.S., et al., 2006. Chronic exposure to U18666A is associated with oxidative stress in cultured murine cortical neurons. *J Neurochem.* 98, 1278-1289.



- Koopman, W.J., Nijtmans, L.G., Dieteren, C.E., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J.A., et al., 2010. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal.* 12, 1431-1470.
- Korenchevsky, V., 1961. *Physiological and Pathological Aging.* S. Karger, Basel.
- Koshkin, V., Greenberg, M.L., 2002. Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochem J.* 364, 317-322.
- Ku, H.H., Brunk, U.T., Sohal, R.S., 1993. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med.* 15, 621-627.
- Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E., Kunz, W.S., 2004. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem.* 279, 4127-4135.
- Kudin, A.P., Debska-Vielhaber, G., Kunz, W.S., 2005. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed Pharmacother.* 59, 163-168.
- Kumagai, H., Katoh, S., Hirose, K., Kimura, M., Hishida, A., Ikegaya, N., 2002. Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia. *Kidney Int.* 62, 1219-1228.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A., 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J.* 368, 545-553.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., et al., 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell.* 127, 1109-1122.
- Lai, L., Yan, L., Gao, S., Hu, C.L., Ge, H., Davidow, A., et al., 2013. Type 5 Adenyl Cyclase Increases Oxidative Stress by Transcriptional Regulation of Manganese Superoxide Dismutase via the SIRT1/FoxO3a Pathway. *Circulation.* 127, 1692-1701.
- Lakatta, E.G., 1993. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev.* 73, 413-467.
- Lambert, A.J., Boysen, H.M., Buckingham, J.A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S.N., et al., 2007. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell.* 6, 607-618.
- Lambert, A.J., Buckingham, J.A., Boysen, H.M., Brand, M.D., 2010. Low complex I content explains the low hydrogen peroxide production rate of heart mitochondria from the long-lived pigeon, *Columba livia*. *Aging Cell.* 9, 78-91.
- Lange, C., Nett, J.H., Trumpower, B.L., Hunte, C., 2001. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc<sub>1</sub> complex structure. *EMBO J.* 20, 6591-6600.
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., et al., 2013. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science.* 340, 1567-1570.
- Latorre, A., Moya, A., Ayala, F.J., 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 8649-8653.
- Lee, H.C., Wei, Y.H., 2012. Mitochondria and aging. *Adv Exp Med Biol.* 942, 311-327.
- Lenaz, G., 2012a. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol.* 942, 93-136.
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M.L., Bergamini, C., Bianchi, C., Biondi, A., 2006. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta.* 1757, 1406-1420.
- Lenaz, G., Genova, M.L., 2010. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal.* 12, 961-1008.

- Lenaz, G., Genova, M.L., 2012b. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol.* 748, 107-144.
- Lenton, L.M., Behm, C.A., Bygrave, F.L., 1995. Aberrant mitochondrial respiration in the livers of rats infected with *Fasciola hepatica*: the role of elevated non-esterified fatty acids and altered phospholipid composition. *Biochem J.* 307 ( Pt 2), 425-431.
- Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H., Huang, Y.S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res.* 43, 36-54.
- Lin, A.H., Chen, H.W., Liu, C.T., Tsai, C.W., Lii, C.K., 2012. Activation of Nrf2 is required for up-regulation of the pi class of glutathione S-transferase in rat primary hepatocytes with L-methionine starvation. *J Agric Food Chem.* 60, 6537-6545.
- Lindholm, L.H., Carlberg, B., Samuelsson, O., 2005. Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *Lancet.* 366, 1545-1553.
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S., Stanley, W.C., 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev.* 90, 207-258.
- Lopez-Lluch, G., Irueta, P.M., Navas, P., de Cabo, R., 2008. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol.* 43, 813-819.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell.* 153, 1194-1217.
- Lopez-Torres, M., Barja, G., 2008. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta.* 1780, 1337-1347.
- Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A., Barja, G., 2002. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 32, 882-889.
- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G., 1993. Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and basal and maximum aerobic capacity. *Mech Ageing Dev.* 70, 177-199.
- Lorenzini, A., Tresini, M., Mawal-Dewan, M., Frisoni, L., Zhang, H., Allen, R.G., et al., 2002. Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt(PKB) pathways in fibroblast senescence. *Exp Gerontol.* 37, 1149-1156.
- Loschen, G., Flohe, L., Chance, B., 1971. Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.* 18, 261-264.
- Lough, A.N., Roark, L.M., Kato, A., Ream, T.S., Lamb, J.C., Birchler, J.A., et al., 2008. Mitochondrial DNA transfer to the nucleus generates extensive insertion site variation in maize. *Genetics.* 178, 47-55.
- Madsen, M.A., Hsieh, C.C., Boylston, W.H., Flurkey, K., Harrison, D., Papaconstantinou, J., 2004. Altered oxidative stress response of the long-lived Snell dwarf mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 318, 998-1005.
- Maillard, L.C., 1912. Action des acides amines sur les sucres: Formation des melanoidines par voie methodique. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 154, 66-68.
- Mair, W., Dillin, A., 2008. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem.* 77, 727-754.
- Malloy, V.L., Krajcik, R.A., Bailey, S.J., Hristopoulos, G., Plummer, J.D., Orentreich, N., 2006. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell.* 5, 305-314.
- Mangano, D.T., Layug, E.L., Wallace, A., Tateo, I., 1996. Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *N Engl J Med.* 335, 1713-1720.

- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A.I., Lenaz, G., Genova, M.L., 2013. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid Redox Signal*. 19, 1469-1480.
- Margulis, L., 1970. Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts? *J Theor Biol*. 26, 337-342.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. 424, 83-95.
- Marnett, L.J., Plastaras, J.P., 2001. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet*. 17, 214-221.
- Martin, B., Mattson, M.P., Maudsley, S., 2006. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev*. 5, 332-353.
- Martin, W., 2003. Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 8612-8614.
- Matsugo, S., Kitagawa, T., Minami, S., Esashi, Y., Oomura, Y., Tokumaru, S., et al., 2000. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neurosci Lett*. 278, 105-108.
- Mattison, J.A., Roth, G.S., Beasley, T.M., Tilmont, E.M., Handy, A.M., Herbert, R.L., et al., 2012. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*. 489, 318-321.
- Mattson, M.P., 2002. Brain evolution and lifespan regulation: conservation of signal transduction pathways that regulate energy metabolism. *Mech Ageing Dev*. 123, 947-953.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A., 1935. The effect of retarded growth upon the length of the life-span and ultimate body size. *J Nutr*. 10, 63-79.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244, 6049-6055.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T., 2006. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J Mol Biol*. 361, 462-469.
- Meana, J.J., Garcia-Sevilla, J.A., Fármacos que modifican la actividad simpática. In: J. Florez, (Ed.), *Farmacología Humana*, Ed. Masson ed2003, pp. 281-295.
- Medvedev, Z.A., 1990. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 65, 375-398.
- Mela, L., Seitz, S., 1979. Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods Enzymol*. 55, 39-46.
- Mileykovskaya, E., Penczek, P.A., Fang, J., Mallampalli, V.K., Sparagna, G.C., Dowhan, W., 2012. Arrangement of the respiratory chain complexes in *Saccharomyces cerevisiae* supercomplex III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> revealed by single particle cryo-electron microscopy. *J Biol Chem*. 287, 23095-23103.
- Mileykovskaya, E., Zhang, M., Dowhan, W., 2005. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry (Mosc)*. 70, 154-158.
- Milne, B., Hong, M., 2004. Increasing longevity by decreasing sympathetic stress--early beta receptor blockade pharmacotherapy. *Med Hypotheses*. 62, 755-758.
- Miller, D.S., Payne, P.R., 1968. Longevity and protein intake. *Exp Gerontol*. 3, 231-234.
- Miller, R.A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J.M., Sigler, R., Smith-Wheelock, M., 2005. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell*. 4, 119-125.
- Miller, R.A., Harper, J.M., Dysko, R.C., Durkee, S.J., Austad, S.N., 2002a. Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 227, 500-508.
- Miller, R.A., Harrison, D.E., Astle, C.M., Baur, J.A., Boyd, A.R., de Cabo, R., et al., 2011. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 66, 191-201.

- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson, J.E., Jr., 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 15, 575-591.
- Mitchell, P., 1975. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett.* 56, 1-6.
- Mitchell, T.W., Buffenstein, R., Hulbert, A.J., 2007. Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): a comparative study using shotgun lipidomics. *Exp Gerontol.* 42, 1053-1062.
- Moller, M., Botti, H., Batthyany, C., Rubbo, H., Radi, R., Denicola, A., 2005. Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 280, 8850-8854.
- Mori, N., Hirayama, K., 2000. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J Nutr.* 130, 2349-2355.
- Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., et al., 2006. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 124, 315-329.
- Muller, F., 2000. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: its relevance to aging. *Age.* 23, 227-253.
- Muller, F.L., Liu, Y., Abdul-Ghani, M.A., Lustgarten, M.S., Bhattacharya, A., Jang, Y.C., et al., 2008. High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem J.* 409, 491-499.
- Muller, F.L., Liu, Y., Van Remmen, H., 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 279, 49064-49073.
- Mulligan, C.M., Le, C.H., Demooy, A.B., Nelson, C.B., Chicco, A.J., 2014. Inhibition of Delta-6 Desaturase Reverses Cardiolipin Remodeling and Prevents Contractile Dysfunction in the Aged Mouse Heart Without Altering Mitochondrial Respiratory Function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*
- Munro, D., Blier, P.U., 2012. The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell.* 11, 845-855.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 417, 1-13.
- Murray, J., Taylor, S.W., Zhang, B., Ghosh, S.S., Capaldi, R.A., 2003. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem.* 278, 37223-37230.
- Nakagawa, T., Lomb, D.J., Haigis, M.C., Guarente, L., 2009. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell.* 137, 560-570.
- Nakamura, M.T., Cheon, Y., Li, Y., Nara, T.Y., 2004. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids.* 39, 1077-1083.
- Naudi, A., Caro, P., Jove, M., Gomez, J., Boada, J., Ayala, V., et al., 2007. Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res.* 10, 473-484.
- Naudi, A., Jove, M., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G., Pamplona, R., 2013. Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. *Front Physiol.* 4, 372.
- Naudi, A., Jove, M., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G., Pamplona, R., 2013b. Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. *Front Physiol.* 4, 372.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2009. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th edition. Ediciones Omega, S.A.
- Newberg, A., Cotter, A., Udeshi, M., Brinkman, F., Glosser, G., Alavi, A., et al., 2003. Brain metabolism in the cerebellum and visual cortex correlates with neuropsychological testing in patients with Alzheimer's disease. *Nucl Med Commun.* 24, 785-790.
- Nojima, A., Yamashita, M., Yoshida, Y., Shimizu, I., Ichimiya, H., Kamimura, N., et al., 2013. Haploinsufficiency of akt1 prolongs the lifespan of mice. *PLoS One.* 8, e69178.

- Nystrom, T., 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 24, 1311-1317.
- Olovnikov, A.M., 1971. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 201, 1496-1499.
- Onken, B., Driscoll, M., 2010. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One.* 5, e8758.
- Orentreich, N., Matias, J.R., DeFelice, A., Zimmerman, J.A., 1993. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr.* 123, 269-274.
- Orgel, L.E., 1963. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 49, 517-521.
- Pamplona, R., 2008. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta.* 1777, 1249-1262.
- Pamplona, R., 2011. Advanced lipoxidation end-products. *Chem Biol Interact.* 192, 14-20.
- Pamplona, R., Barja, G., 2006. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta.* 1757, 496-508.
- Pamplona, R., Barja, G., 2007. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev.* 6, 189-210.
- Pamplona, R., Barja, G., 2011. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology.* 12, 409-435.
- Pamplona, R., Barja, G., Portero-Otín, M., 2002. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann N Y Acad Sci.* 959, 475-490.
- Pamplona, R., Barja, G., Portero-Otín, M., 2002c. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann N Y Acad Sci.* 959, 475-490.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 301, R843-863.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Bellmunt, M.J., Gredilla, R., Barja, G., 2002a. Aging increases Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases Nepsilon-(carboxyethyl)lysine and Nepsilon-(malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Radic Res.* 36, 47-54.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, J., Gredilla, R., Barja, G., 2002b. Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech Ageing Dev.* 123, 1437-1446.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, J.R., Thorpe, S.R., Herrero, A., Barja, G., 1999a. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev.* 106, 283-296.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Ledo, F., Gredilla, R., Herrero, A., et al., 1999b. Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging (Milano).* 11, 44-49.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Requena, J.R., Thorpe, S.R., Lopez-Torres, M., et al., 2000. Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55, B286-291.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Ruiz, C., Prat, J., Bellmunt, M.J., et al., 1998b. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J Lipid Res.* 39, 1989-1994.

- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Sanz, A., Requena, J., Barja, G., 2004. Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp Gerontol.* 39, 725-733.
- Pamplona, R., Prat, J., Cadenas, S., Rojas, C., Páez-Campo, R., López Torres, M., et al., 1996a. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech Ageing Dev.* 86, 53-66.
- Pamplona, R., Prat, J., Cadenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R., Lopez Torres, M., et al., 1996b. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech Ageing Dev.* 86, 53-66.
- Papa, S., Martino, P.L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmo, D., Signorile, A., et al., 2012. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol.* 942, 3-37.
- Park, C.M., Cho, C.W., Rosenfeld, M.E., Song, Y.S., 2008. Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. *J Med Food.* 11, 667-674.
- Park, J.W., Choi, C.H., Kim, M.S., Chung, M.H., 1996. Oxidative status in senescence-accelerated mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 51, B337-345.
- Pearl, R., The rate of living: being an account of some experimental studies on the biology of life duration, A.A. Knopf 1928.
- Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., et al., 2008. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* 8, 157-168.
- Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Cadenas, S., Rojas, C., Barja, G., 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol B.* 168, 149-158.
- Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G., 1994. Longevity and antioxidant enzymes, non-enzymatic antioxidants and oxidative stress in the vertebrate lung: a comparative study. *J Comp Physiol B.* 163, 682-689.
- Perrone, C.E., Malloy, V.L., Orentreich, D.S., Orentreich, N., 2012a. Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents. *Exp Gerontol.*
- Perrone, C.E., Malloy, V.L., Orentreich, D.S., Orentreich, N., 2013. Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents. *Exp Gerontol.* 48, 654-660.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., et al., 2003. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.* 278, 52873-52880.
- Polidori, M.C., Pratico, D., Parente, B., Mariani, E., Cecchetti, R., Yao, Y., et al., 2007. Elevated lipid peroxidation biomarkers and low antioxidant status in atherosclerotic patients with increased carotid or iliofemoral intima media thickness. *J Investig Med.* 55, 163-167.
- Porter, A.G., Urbano, A.G., 2006. Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays.* 28, 834-843.
- Portero-Otin, M., Bellmunt, M.J., Ruiz, M.C., Barja, G., Pamplona, R., 2001. Correlation of fatty acid unsaturation of the major liver mitochondrial phospholipid classes in mammals to their maximum life span potential. *Lipids.* 36, 491-498.
- Pratt, D.A., Tallman, K.A., Porter, N.A., 2011. Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Acc Chem Res.* 44, 458-467.
- Puca, A.A., Andrew, P., Novelli, V., Anselmi, C.V., Somalvico, F., Cirillo, N.A., et al., 2008. Fatty acid profile of erythrocyte membranes as possible biomarker of longevity. *Rejuvenation Res.* 11, 63-72.

- Raha, S., Myint, A.T., Johnstone, L., Robinson, B.H., 2002. Control of oxygen free radical formation from mitochondrial complex I: roles for protein kinase A and pyruvate dehydrogenase kinase. *Free Radic Biol Med.* 32, 421-430.
- Raha, S., Robinson, B.H., 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 25, 502-508.
- Refsgaard, H.H., Tsai, L., Stadtman, E.R., 2000. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 611-616.
- Rehsia, N.S., Dhalla, N.S., 2010. Mechanisms of the beneficial effects of beta-adrenoceptor antagonists in congestive heart failure. *Exp Clin Cardiol.* 15, e86-95.
- Remondino, A., Kwon, S.H., Communal, C., Pimentel, D.R., Sawyer, D.B., Singh, K., et al., 2003. Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Circ Res.* 92, 136-138.
- Requena, J.R., Fu, M.X., Ahmed, M.U., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Baynes, J.W., et al., 1997. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem J.* 322 ( Pt 1), 317-325.
- Rich, P.R., Marechal, A., 2010. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 47, 1-23.
- Richie, J.P., Jr., Leutzinger, Y., Parthasarathy, S., Malloy, V., Orentreich, N., Zimmerman, J.A., 1994. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J.* 8, 1302-1307.
- Richter, C., 1988. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* 241, 1-5.
- Roach, C., Feller, S.E., Ward, J.A., Shaikh, S.R., Zerouga, M., Stillwell, W., 2004. Comparison of cis and trans fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties. *Biochemistry.* 43, 6344-6351.
- Robblee, N.M., Clandinin, M.T., 1984. Effect of dietary fat level and polyunsaturated fatty acid content on the phospholipid composition of rat cardiac mitochondrial membranes and mitochondrial ATPase activity. *J Nutr.* 114, 263-269.
- Rogina, B., Helfand, S.L., 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 15998-16003.
- Ross, M.H., 1976. Nutrition and longevity in experimental animals. *Curr Concepts Nutr.* 4, 43-57.
- Rubio, A.R., Morales-Segura, M.A., 2004. Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Arch Med Res.* 35, 1-11.
- Ruch, W., Cooper, P.H., Baggiolini, M., 1983. Assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. *J Immunol Methods.* 63, 347-357.
- Ruiz, M.C., Ayala, V., Portero-Otin, M., Requena, J.R., Barja, G., Pamplona, R., 2005. Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev.* 126, 1106-1114.
- Sanchez-Roman, I., Barja, G., 2013a. Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: role of methionine restriction. *Exp Gerontol.* 48, 1030-1042.
- Sanchez-Roman, I., Barja, G., 2013b. Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: Role of methionine restriction. *Exp Gerontol.*
- Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Gomez, J., Suarez, H., Sanchez, C., Naudi, A., et al., 2011. Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J Bioenerg Biomembr.* 43, 699-708.
- Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Naudi, A., Jove, M., Gomez, J., Lopez-Torres, M., et al., 2013. Independent and additive effects of atenolol and methionine restriction on lowering rat heart mitochondria oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr.*

- Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Perez, I., Sanchez, C., Suarez, H., Naudi, A., et al., 2012. Effects of aging and methionine restriction applied at old age on ROS generation and oxidative damage in rat liver mitochondria. *Biogerontology*. 13, 399-411.
- Sanchez-Roman, I., Gomez, J., Naudi, A., Ayala, V., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., et al., 2010. The beta-blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage, and increases extracellular signal-regulated kinase signaling in the heart of C57BL/6 mice. *Rejuvenation Res.* 13, 683-693.
- Sanders, V.M., 2012. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet? *Brain Behav Immun.* 26, 195-200.
- Sanz, A., Caro, P., Ayala, V., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Barja, G., 2006d. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* 20, 1064-1073.
- Sanz, A., Caro, P., Barja, G., 2004. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr.* 36, 545-552.
- Sanz, A., Caro, P., Ibanez, J., Gomez, J., Gredilla, R., Barja, G., 2005a. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomembr.* 37, 83-90.
- Sanz, A., Pamplona, R., Barja, G., 2006a. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal.* 8, 582-599.
- Sanz, A., Soikkeli, M., Portero-Otin, M., Wilson, A., Kempainen, E., McIlroy, G., et al., 2010. Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 9105-9110.
- Schagger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777-1783.
- Schagger, H., Pfeiffer, K., 2001. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.* 276, 37861-37867.
- Schieke, S.M., Phillips, D., McCoy, J.P., Jr., Aponte, A.M., Shen, R.F., Balaban, R.S., et al., 2006. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem.* 281, 27643-27652.
- Schlame, M., 2013. Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochim Biophys Acta.* 1831, 582-588.
- Schlame, M., Ren, M., Xu, Y., Greenberg, M.L., Haller, I., 2005. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids.* 138, 38-49.
- Schmidt-Neilsen K., L.J.L., 1958. Oxygen dissociation curves of mammalian blood in relation to body size. *Am. J. Physiol.* 195(2), 424-428.
- Schulz, T.J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., Ristow, M., 2007. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.* 6, 280-293.
- Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A.I., Batterham, R.L., Claret, M., Clements, M., et al., 2008. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J.* 22, 807-818.
- Selman, C., Tullet, J.M., Wieser, D., Irvine, E., Lingard, S.J., Choudhury, A.I., et al., 2009. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science.* 326, 140-144.
- Selman, C., Withers, D.J., 2011. Mammalian models of extended healthy lifespan. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366, 99-107.
- Sell, D.R., Lane, M.A., Johnson, W.A., Masoro, E.J., Mock, O.B., Reiser, K.M., et al., 1996. Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 485-490.



- Sevrioukova, I.F., 2011. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal*. 14, 2545-2579.
- Shabalina, I.G., Jacobsson, A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J Biol Chem*. 279, 38236-38248.
- Shay, J.W., Werbin, H., 1992. New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging. *Mutat Res*. 275, 227-235.
- Shimokawa, I., Higami, Y., Yu, B.P., Masoro, E.J., Ikeda, T., 1996. Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Aging (Milano)*. 8, 254-262.
- Shmookler Reis, R.J., Xu, L., Lee, H., Chae, M., Thaden, J.J., Bharill, P., et al., 2011. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging (Albany NY)*. 3, 125-147.
- Smith, D.L., Jr., Elam, C.F., Jr., Mattison, J.A., Lane, M.A., Roth, G.S., Ingram, D.K., et al., 2010. Metformin supplementation and life span in Fischer-344 rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 65, 468-474.
- Smith, S., 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J*. 8, 1248-1259.
- Sohal, R.S., Ku, H.H., Agarwal, S., Forster, M.J., Lal, H., 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev*. 74, 121-133.
- Sohal, R.S., Sohal, B.H., Brunk, U.T., 1990. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech Ageing Dev*. 53, 217-227.
- Sohal, R.S., Svensson, I., Sohal, B.H., Brunk, U.T., 1989. Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech Ageing Dev*. 49, 129-135.
- Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., et al., 2010. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*. 143, 802-812.
- Speakman, J.R., 2003. Oxidative phosphorylation, mitochondrial proton cycling, free-radical production and aging. *Advances in Cell Aging and Gerontology*. 14, 35-68.
- Spindler, S.R., 2012. Review of the literature and suggestions for the design of rodent survival studies for the identification of compounds that increase health and life span. *Age (Dordr)*. 34, 111-120.
- Spindler, S.R., Mote, P.L., Li, R., Dhahbi, J.M., Yamakawa, A., Flegel, J.M., et al., 2013. beta1-Adrenergic receptor blockade extends the life span of *Drosophila* and long-lived mice. *Age (Dordr)*. 35, 2099-2109.
- Spiteller, G., 2001. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp Gerontol*. 36, 1425-1457.
- Spiteller, G., 2010. Is lipid peroxidation of polyunsaturated acids the only source of free radicals that induce aging and age-related diseases? *Rejuvenation Res*. 13, 91-103.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 277, 44784-44790.
- Stadtman, E.R., 2004. Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation. *Arch Biochem Biophys*. 423, 2-5.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2000. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*. 899, 191-208.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 25, 207-218.
- Stanley, W.C., Khairallah, R.J., Dabkowski, E.R., 2012. Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 15, 122-126.

- Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Kempf, R.C., Long, J., Laidler, P., et al., 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 3, 192-222.
- Stoffel, W., Holz, B., Jenke, B., Binczek, E., Gunter, R.H., Kiss, C., et al., 2008. Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO J*. 27, 2281-2292.
- Stopinska-Gluszak, U., Waligora, J., Grzela, T., Gluszak, M., Jozwiak, J., Radomski, D., et al., 2006. Effect of estrogen/progesterone hormone replacement therapy on natural killer cell cytotoxicity and immunoregulatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *J Reprod Immunol*. 69, 65-75.
- Strehler, B.L., Time, Cells, and Aging, Academic Press 1962.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., et al., 2004. Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem*. 279, 5000-5007.
- Stroud, C.K., Nara, T.Y., Roqueta-Rivera, M., Radlowski, E.C., Lawrence, P., Zhang, Y., et al., 2009. Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J Lipid Res*. 50, 1870-1880.
- Stuart, J.A., Mayard, S., Hashiguchi, K., Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2005. Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic Acids Res*. 33, 3722-3732.
- Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X., et al., 2007. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab*. 6, 307-319.
- Sun, L., Sadighi Akha, A.A., Miller, R.A., Harper, J.M., 2009. Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 64, 711-722.
- Szillard, L., 1959. On the Nature of the Aging Process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 45, 30-45.
- Taylor, E.R., Hurrell, F., Shannon, R.J., Lin, T.K., Hirst, J., Murphy, M.P., 2003. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J Biol Chem*. 278, 19603-19610.
- Terlecky, S.R., Koepke, J.I., Walton, P.A., 2006. Peroxisomes and aging. *Biochim Biophys Acta*. 1763, 1749-1754.
- Thorpe, S.R., Baynes, J.W., 2003. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids*. 25, 275-281.
- Tissenbaum, H.A., Guarente, L., 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 410, 227-230.
- Torres, C., Francis, M.K., Lorenzini, A., Tresini, M., Cristofalo, V.J., 2003. Metabolic stabilization of MAP kinase phosphatase-2 in senescence of human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 290, 195-206.
- Troen, A.M., Lutgens, E., Smith, D.E., Rosenberg, I.H., Selhub, J., 2003. The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 15089-15094.
- Tsai, C.W., Lin, A.H., Wang, T.S., Liu, K.L., Chen, H.W., Lii, C.K., 2010. Methionine restriction up-regulates the expression of the pi class of glutathione S-transferase partially via the extracellular signal-regulated kinase-activator protein-1 signaling pathway initiated by glutathione depletion. *Mol Nutr Food Res*. 54, 841-850.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., et al., 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 272, 1136-1144.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 552, 335-344.
- Turrens, J.F., Alexandre, A., Lehninger, A.L., 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 237, 408-414.

- Tvrđik, P., Westerberg, R., Silve, S., Asadi, A., Jakobsson, A., Cannon, B., et al., 2000. Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. *J Cell Biol.* 149, 707-718.
- Tyler, D.D., The mitochondrion in health and disease, VCH1992.
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J.J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., et al., 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23, 4679-4689.
- van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 112-124.
- Vance, D.E., Vance, J.E., 1996. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier Science VB, Amsterdam, The Netherlands. 31.
- Vatner, S.F., Park, M., Yan, L., Lee, G.J., Lai, L., Iwatsubo, K., et al., 2013. Adenylyl cyclase type 5 in cardiac disease, metabolism, and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 305, H1-8.
- Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., Muller, F., 2003. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature.* 426, 620.
- Viswanathan, M., Guarente, L., 2011. Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by sir-2.1 transgenes. *Nature.* 477, E1-2.
- Viveros, M.P., Arranz, L., Hernanz, A., Miquel, J., De la Fuente, M., 2007. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation.* 14, 157-162.
- Votyakova, T.V., Reynolds, I.J., 2001. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem.* 79, 266-277.
- Waford, R.L., 1969. *The Immunological Theory of Aging*. Munksgaard, Copenhagen.
- Wakil, S.J., Stoops, J.K., Joshi, V.C., 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem.* 52, 537-579.
- Weindruch, R., 2003. Caloric restriction, gene expression, and aging. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 17 Suppl 2, S58-59.
- Weindruch, R., Naylor, P.H., Goldstein, A.L., Walford, R.L., 1988. Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. *J Gerontol.* 43, B40-42.
- Wiley, S.E., Murphy, A.N., Ross, S.A., van der Geer, P., Dixon, J.E., 2007. MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 5318-5323.
- Williams, A., Kenny, D., Wilson, D., Fagenello, G., Nelson, M., Dunstan, F., et al., 2012. Effects of atenolol, perindopril and verapamil on haemodynamic and vascular function in Marfan syndrome - a randomised, double-blind, crossover trial. *Eur J Clin Invest.* 42, 891-899.
- Winczura, A., Zdzalik, D., Tudek, B., 2012. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic Res.* 46, 442-459.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., et al., 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature.* 430, 686-689.
- Xu, Y., Condell, M., Plesken, H., Edelman-Novemsky, I., Ma, J., Ren, M., et al., 2006. A *Drosophila* model of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 11584-11588.
- Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry.* 42, 2266-2274.
- Yamaoka, S., Urade, R., Kito, M., 1988. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr.* 118, 290-296.
- Yamate, J., Tajima, M., Kudow, S., Sannai, S., 1990. Background pathology in BDF1 mice allowed to live out their life-span. *Lab Anim.* 24, 332-340.
- Yan, L., Park, J.Y., Dillinger, J.G., De Lorenzo, M.S., Yuan, C., Lai, L., et al., 2012. Common mechanisms for calorie restriction and adenylyl cyclase type 5 knockout models of longevity. *Aging Cell.* 11, 1110-1120.

- Yan, L., Vatner, D.E., O'Connor, J.P., Ivessa, A., Ge, H., Chen, W., et al., 2007. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell*. 130, 247-258.
- Yin, D., Chen, K., 2005. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Exp Gerontol*. 40, 455-465.
- Yu, B.P., Masoro, E.J., McMahan, C.A., 1985. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol*. 40, 657-670.
- Zadavec, D., Tvrdik, P., Guillou, H., Haslam, R., Kobayashi, T., Napier, J.A., et al., 2011. ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J Lipid Res*. 52, 245-255.
- Zara, V., Conte, L., Trumpower, B.L., 2009. Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *FEBS J*. 276, 1900-1914.
- Zhen, X., Uryu, K., Cai, G., Johnson, G.P., Friedman, E., 1999. Age-associated impairment in brain MAPK signal pathways and the effect of caloric restriction in Fischer 344 rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 54, B539-548.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., et al., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 108, 1167-1174.
- Zimniak, P., 2011. Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radic Biol Med*. 51, 1087-1105.



## RESUMEN GENERAL/ GENERAL SUMMARY



## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un fenómeno que ha inquietado al hombre desde que adquiere consciencia de su propia muerte. Existen numerosas teorías que intentan explicarlo, entre ellas, la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres (Harman, 1972; Miquel et al., 1980) es la que se ve confirmada en la actualidad por numerosas evidencias procedentes tanto de la Biología Comparada como de la Biología Experimental. Según esta teoría, las mitocondrias y particularmente los complejos I y III de la cadena respiratoria producen radicales libres derivados del oxígeno (ROS) que pueden dañar oxidativamente diferentes componentes celulares, contribuyendo al envejecimiento del organismo.

Por un lado, los datos procedentes de la Biología Comparada han demostrado que las especies longevas presentan una baja producción mitocondrial de ROS por parte del complejo I de la cadena respiratoria y un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares de sus tejidos (índice de dobles enlaces, DBI), lo que las hace más resistentes al daño oxidativo y reduce la peroxidación lipídica (PI, índice de peroxidación) en comparación con las especies de vida corta (Pamplona y Barja, 2011).

Por otra parte, los datos obtenidos en Biología Experimental nos muestran como algunas manipulaciones, como la restricción de dieta (DR), la manipulación mejor conocida que incrementa la longevidad en la mayoría de los organismos estudiados (McCay et al., 1935), reduce la producción mitocondrial de ROS en el complejo I y el daño oxidativo mitocondrial en la mayoría de los tejidos en los que ha sido estudiado (Gredilla y Barja, 2005). Al tratar de averiguar que componente de la dieta era el responsable de estos efectos beneficiosos sobre la longevidad, se llegó a la conclusión de que la restricción proteica (PR), y en concreto del aminoácido metionina al 80% (MetR) son capaces de incrementar la longevidad máxima reduciendo la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo en roedores (Lopez-Torres y Barja, 2008). Al comprobar que estas intervenciones tenían efectos negativos sobre el crecimiento, se disminuyó el porcentaje de MetR hasta un 40%, que es también el porcentaje efectivo



en la DR. Aunque todavía no se ha comprobado experimentalmente que la MetR al 40% aumente la longevidad máxima, si se ha demostrado que tiene efectos similares y beneficiosos sobre algunos parámetros relacionados con el envejecimiento mencionados anteriormente, como producción mitocondrial de ROS y daño oxidativo a macromoléculas en diferentes tejidos de roedores estudiados [revisado en (Sanchez-Roman y Barja, 2013)].

Estas manipulaciones en la dieta actúan sobre la longevidad máxima modificando uno de los factores que correlacionan directamente con ella: la producción mitocondrial de ROS. Pero, ¿Qué ocurre con el segundo de los factores, el bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana?

Existe un modelo reciente, descrito por Yan y colaboradores, basado en la interrupción de la señalización  $\beta$ -adrenérgica ( $\beta$ -AR) mediante el bloqueo de la expresión génica de la adenilato ciclasa tipo 5 (AC5) en ratones AC5 Knockout (AC5KO). Estos ratones AC5KO muestran mayor longevidad tanto media como máxima y presentan mayor resistencia al estrés oxidativo. Sin embargo, los mecanismos que conducen a estos efectos beneficiosos no se han aclarado (Yan et al., 2007). Una primera aproximación se llevó a cabo en nuestro grupo de investigación, mimetizando farmacológicamente este modelo mediante el bloqueo de los receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos con el bloqueante  $\beta$ -1 adrenérgico atenolol (Sanchez-Roman et al., 2010), obteniendo un descenso en el DBI y el PI, así como en un marcador de daño lipoxidativo a proteínas (MDAL) con solo 2 semanas de tratamiento. A la vista de estos resultados, el tratamiento con atenolol parece un modelo prometedor para demostrar la relación causal existente entre el perfil lipídico de las membranas y la longevidad. Además de farmacológicamente, sería interesante comprobar si una manipulación genética en la vía de síntesis y elongación de los ácidos grasos (Zdravec et al., 2011) puede modificar parámetros mitocondriales y relacionados con el estrés oxidativo.

Así, el objetivo general de esta tesis es determinar si manipulaciones experimentales como el tratamiento con atenolol, solo o en combinación con la restricción de metionina, así como la ausencia del gen *Elovl2*, pueden mejorar parámetros relacionados con el estrés oxidativo mitocondrial y la longevidad en

mamíferos. Este objetivo general, pretende resolverse mediante diferentes objetivos concretos: 1. Determinar si el efecto del atenolol a corto plazo (2 semanas) en ratones, se podría extrapolar a otras especies como la rata Wistar. 2. Poner a prueba si la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana mediante el bloqueo a largo plazo de la señalización  $\beta$ -adrenérgica con el fármaco atenolol, es capaz de incrementar la longevidad máxima en ratones B6D2F1. 3. Evaluar los efectos que producen el tratamiento con atenolol, la restricción de metionina y los dos tratamientos a la vez, durante 7 semanas, sobre el estrés oxidativo y el envejecimiento en hígado de rata Wistar. 4. Determinar los efectos que produce la ausencia del gen *Elovl2* sobre el perfil lipídico, la función mitocondrial y el estrés oxidativo en hígado de ratones 127sv.

## **CONTENIDO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1. Efecto agudo del atenolol en corazón de rata Wistar**

Esta investigación se llevó a cabo para determinar si la inhibición de la señalización  $\beta$ -adrenérgica mediante el tratamiento con atenolol se podía extrapolar a otras especies animales más longevas y a animales genéticamente heterogéneos (como la rata Wistar), ya que los ratones C57BL/6 son una cepa con características específicas y un genoma similar.

La administración de atenolol en el agua de bebida durante dos semanas, disminuyó significativamente el índice de peroxidizabilidad, así como el daño lipoxidativo a proteínas, la cantidad de la subunidad NDUFA9 del complejo I y de la proteína MnSOD. Así mismo, no se observaron diferencias en el consumo mitocondrial de oxígeno, la producción de ROS ni en el daño al ADN mitocondrial. Estos resultados, de acuerdo con los obtenidos previamente en corazón de ratón (Sanchez-Roman, 2010) apoyan la posibilidad de que el incremento de la longevidad producido por el bloqueo de la expresión de la adenilato ciclasa 5 (Yan et al, 2007) podría deberse a una disminución en la peroxidación lipídica y en consecuencia una disminución del daño lipoxidativo a proteínas celulares.

## 2. Efecto del atenolol en corazón y músculo de ratones B6D2F1 durante todo el ciclo vital.

Un trabajo reciente en *C. elegans* muestra que la longevidad de diferentes cepas de gusanos longevos mutantes, con un perfil genético parecido, correlaciona con el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana en el mismo sentido en que lo hace en las especies longevas (Shmookler Reis et al., 2011). Sin embargo, no existen investigaciones que relacionen experimentalmente este parámetro con la longevidad en mamíferos, debido a las dificultades que conlleva. Aprovechando la capacidad del atenolol para modificar este parámetro, decidimos poner por primera vez a prueba la hipótesis de que la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas puede extender la longevidad en mamíferos.

El tratamiento a largo plazo con atenolol incrementó la cantidad de la proteína ERK demostrando el bloqueo efectivo de la ruta de señalización  $\beta$ -adrenérgica (Yan et al., 2007). Además disminuyó con éxito, por primera vez en mamíferos, el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas de mitocondrias de corazón y de músculo esquelético, cambiando su perfil lipídico y asemejándolo así al que presentan los mamíferos mucho más longevos. Esto se debe sobre todo a un descenso en el ácido graso 22:6n-3 y un aumento en el 18:1n-9, inducido por un descenso en la oxidación  $\beta$ -peroxisómica junto con un descenso en la actividad desaturasa delta-6 y un incremento en la actividad desaturasa delta-9. El tratamiento con atenolol redujo la cantidad de grasa visceral, el daño oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo a proteínas mitocondriales en los dos órganos estudiados y el daño oxidativo al ADN mitocondrial en corazón. Además mejoró varias funciones del sistema inmune y comportamentales, y fue capaz de revertir total o parcialmente algunos de los cambios relacionados con el envejecimiento, tales como cambios en el grado de insaturación de los lípidos de membrana, la inmunidad o el comportamiento, todo ello sin modificar la longevidad máxima. Curiosamente, el tratamiento con atenolol disminuyó significativamente la longevidad solamente en animales muy viejos (entre 1.000 y 1.275 días), y justamente en ese período de tiempo se registró un descenso significativo en la frecuencia cardíaca de los animales tratados con el fármaco. Este hecho está de acuerdo con varios meta-análisis realizados en humanos (Lindholm et al., 2005) que indican que el

tratamiento con atenolol puede disminuir demasiado la frecuencia cardiaca (Bangalore et al., 2008), lo que podría ser un efecto secundario del fármaco y pudo causar la muerte de los animales tratados antes que la de los animales control. Esto mismo ocurrió en otro estudio de longevidad reciente realizado con otros beta-bloqueantes (Spindler et al., 2013).

### 3. Estudio de la interacción entre la restricción de metionina en la dieta y el tratamiento a medio plazo con atenolol en hígado de rata Wistar.

En trabajos previos en nuestro grupo de investigación se comprobó que ambos tratamientos (MetR y atenolol) aplicados conjuntamente tenían efectos aditivos en cuanto a la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos, las cantidades de los complejos I, la cantidad de p-ERK y el daño oxidativo a proteínas en corazón de rata Wistar (Sanchez-Roman et al., 2013). A la vista de estos resultados nos preguntamos si los cambios beneficiosos se extenderían a nivel global del organismo y no solamente a nivel del principal órgano diana. Por ello, decidimos enfocar nuestro estudio hacia otros órganos con una menor cantidad de receptores  $\beta$ -1 y con gran relevancia metabólica y nutricional como es el caso del hígado.

En este caso, se observó un descenso en la producción de ROS en el complejo I mitocondrial en los dos grupos de animales restringidos en metionina, mientras que el atenolol no tuvo ningún efecto sobre este parámetro. Lo mismo ocurrió al estudiar el daño al ADN mitocondrial, que solo fue menor en los animales con dieta restringida en metionina. En este modelo no se observaron cambios en la composición de los ácidos grasos ni en los índices relacionados (DBI y PI), lo que puede deberse a la poca presencia de receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos en hígado. La MetR, tanto en solitario como combinada con atenolol, disminuyó la cantidad de los complejos de la cadena respiratoria y la proteína AIF y aumentó significativamente la cantidad de proteína p-ERK. En cuanto a los marcadores de daño oxidativo, lipoxidativo y glicoxidativo a proteínas, disminuyeron tanto con la restricción de metionina como con la interacción de ambos tratamientos, sin mostrar cambios debidos al tratamiento con atenolol, lo que de nuevo puede ser debido a la poca presencia de receptores  $\beta$ -1 en el hígado.

### 4. Estudio de la función mitocondrial y el estrés oxidativo en ratones ELOVL2 KO.

Tras aproximaciones farmacológicas (atenolol) y dietéticas (MetR) para incidir sobre los factores que correlacionan en el sentido adecuado con la longevidad (baja producción mitocondrial de ROS y bajo grado de insaturación de los ácidos grasos), decidimos probar también el efecto de una manipulación genética: la ausencia del gen *Elovl2*. Nos centramos sobre todo en el estudio del segundo parámetro relevante en la longevidad: el grado de insaturación de los ácidos grasos, dado que el gen *Elovl2* codifica para la enzima elongasa 2 que es crucial en la biosíntesis de PUFA.

Los ratones “Knocked out” para este gen mostraron una función mitocondrial reducida (con un menor RCR). Al mismo tiempo mostraron un menor DBI y PI debido a una redistribución lipídica en las membranas, debido principalmente al fuerte descenso observado en el ácido graso 22:6n-3 en los ratones *Elovl2*KO, y al aumento en el 18:1n-9. Estos cambios en el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas provocó un descenso significativo en el marcador de peroxidación lipídica MDAL, al igual que ocurre en las especies longevas. No se detectaron cambios en la cantidad de algunas proteínas medidas, como los complejos de la cadena respiratoria ni en la proteína mitoNEET.

A pesar de la aparente contradicción entre la resistencia que presentan las membranas frente al estrés oxidativo y la baja eficiencia en la respiración mitocondrial de los ratones *Elovl2*KO, recientemente se ha publicado un trabajo que muestra un incremento de la longevidad en el nematodo *C. elegans* a pesar de tener una disminución en la respiración mitocondrial (Houtkooper et al., 2013). Así podrían surgir nuevos modelos de longevidad, que a diferencia de otros establecidos hasta la fecha que incrementan la respiración mitocondrial (rapamicina), podrían disminuirla y aumentar igualmente la longevidad.

## CONCLUSIONES:

- ◆ El tratamiento con atenolol a corto plazo en rata Wistar disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana de corazón y el daño lipoxidativo a proteínas, del mismo modo que ocurrió en ratones C57BL/6.
- ◆ El tratamiento con atenolol a largo plazo disminuye la cantidad de grasa corporal, el DBI y el PI en ratones viejos y los marcadores de daño oxidativo a

proteínas tanto en corazón como en músculo esquelético. Además se observan mejoras en el sistema inmune y en parámetros comportamentales, así como un descenso en el daño oxidativo al ADN mitocondrial en corazón, y un aumento de la cantidad de proteína p-ERK en ambos órganos, sin llegar a aumentar la longevidad máxima debido probablemente a efectos secundarios del fármaco, como un descenso de la frecuencia cardíaca en animales muy viejos.

- ◆ El tratamiento combinado de atenolol y MetR en hígado de rata, no produce efectos aditivos, sino que únicamente se observan cambios debidos a la MetR, lo que sugiere que el atenolol actúa de manera específica sobre sus órganos diana (corazón y músculo esquelético), y sus efectos en otros tejidos como el hígado son prácticamente inexistentes.
- ◆ La ausencia del gen Elov12, produce una redistribución del perfil lipídico en mitocondrias de hígado de ratón, disminuyendo el DBI y el PI y reduciendo además el daño lipoxidativo a proteínas. Por otro lado las mitocondrias de hígado de estos ratones Elov12KO presentan un menor RCR (ratio ADP/oligomicina).

## BIBLIOGRAFÍA

- Bangalore, S., Sawhney, S., Messerli, F.H., 2008. Relation of beta-blocker-induced heart rate lowering and cardioprotection in hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 52, 1482-1489.
- Gredilla, R., Barja, G., 2005. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology.* 146, 3713-3717.
- Harman, D., 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 20, 145-147.
- Houtkooper, R.H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moullan, N., Katsyuba, E., Knott, G., et al., 2013. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature.* 497, 451-457.
- Lindholm, L.H., Carlberg, B., Samuelsson, O., 2005. Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *Lancet.* 366, 1545-1553.
- Lopez-Torres, M., Barja, G., 2008. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta.* 1780, 1337-1347.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A., 1935. The effect of retarded growth upon the length of the life-span and ultimate body size. *J Nutr.* 10, 63-79.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson, J.E., Jr., 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 15, 575-591.
- Pamplona, R., Barja, G., 2011. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology.* 12, 409-435.
- Sanchez-Roman, I., Barja, G., 2013. Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: role of methionine restriction. *Exp Gerontol.* 48, 1030-1042.

- Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Naudi, A., Jove, M., Gomez, J., Lopez-Torres, M., et al., 2013. Independent and additive effects of atenolol and methionine restriction on lowering rat heart mitochondria oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr.*
- Sanchez-Roman, I., Gomez, J., Naudi, A., Ayala, V., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., et al., 2010. The beta-blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage, and increases extracellular signal-regulated kinase signaling in the heart of C57BL/6 mice. *Rejuvenation Res.* 13, 683-693.
- Shmookler Reis, R.J., Xu, L., Lee, H., Chae, M., Thaden, J.J., Bharill, P., et al., 2011. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging (Albany NY).* 3, 125-147.
- Spindler, S.R., Mote, P.L., Li, R., Dhahbi, J.M., Yamakawa, A., Flegal, J.M., et al., 2013. beta1-Adrenergic receptor blockade extends the life span of *Drosophila* and long-lived mice. *Age (Dordr).* 35, 2099-2109.
- Yan, L., Vatner, D.E., O'Connor, J.P., Ivessa, A., Ge, H., Chen, W., et al., 2007. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell.* 130, 247-258.
- Zdravec, D., Tvrdik, P., Guillou, H., Haslam, R., Kobayashi, T., Napier, J.A., et al., 2011. ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J Lipid Res.* 52, 245-255.

**TITLE:** Effect of chronic atenolol treatment, its combination with dietary methionine restriction and effect of the lack of the Elov12 gen on lipid composition, oxidative stress and longevity in rodents.

## **SUMMARY**

### **INTRODUCTION**

Aging is a fact that has puzzled man since he became aware of his own death. Many theories have tried to explain it. Among them, The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging is currently supported by different evidences coming from Comparative Biology and Experimental Biology (Pamplona y Barja, 2011). According to this theory (Harman, 1972; Miquel et al., 1980), mitochondria, and particularly respiratory complexes I and III are important sources of reactive oxygen species (ROS) that can damage different kind of cellular macromolecules.

Data coming from Comparative Biology have demonstrated that long lived species show low rates of mitochondrial ROS production at complex I and low fatty acid unsaturation degree in their membranes (Pamplona y Barja, 2011). The first factor (low mitochondrial ROS production) reduces the oxidative damage to the mitochondria, and the second one (low fatty acid unsaturation degree) gives them a high resistance to oxidative modification, which is obtained by decreasing the number of fatty acid double bounds (DBI, double bound index) (Pamplona et al., 2002; Hulbert et al., 2007).

In the other hand, experimental studies also link longevity and oxidative stress. Different experimental manipulations like dietary restriction (DR), the best known manipulation that increases lifespan in many different organisms, also lowers the rate of mitochondrial ROS production at complex I and mitochondrial oxidative damage in many vital tissue (Gredilla y Barja, 2005). In order to determine which component of the diet was responsible for these effects, different nutritional interventions were performed. Finally it was concluded that neither carbohydrate nor lipid restriction have any effect on longevity. However, protein restriction (PR) and, specifically 80% methionine restriction (MetR) are able to increase maximum lifespan decreasing



mitochondrial ROS production and oxidative damage in rodents (Lopez-Torres y Barja, 2008). However, 80% MetR and DR induce negative effects such as growing delay and decreased final body size. Then, the percentage of MetR was reduced until 40%, which is also the effective percentage in DR. Although the effect of 40% MetR on maximum lifespan has not been tested yet, this manipulation has positive effects on the oxidative stress related parameters mentioned above linked to aging, like the low mitochondrial ROS production and oxidative damage to macromolecules in many vital tissues in rodents, without changes in body size (Sanchez-Roman y Barja, 2013).

These manipulations impact on longevity by means of changes in the mitochondrial ROS production, but, what is happening with the other factor linked with longevity in the right sense (fatty acid unsaturation degree)?

Recently, a new longevity model based on the disruption of  $\beta$ -adrenergic signalling ( $\beta$ -AR) by the blockade of adenylyl cyclase type 5 (AC5) has been characterized. These mice AC5KO show higher mean and maximum longevity and higher resistance to oxidative stress. However, the mechanisms by means these animals get that beneficial effects have not already been elucidated (Yan et al., 2007). In our research group, we decide to mimic pharmacologically this model with the  $\beta$ -1 adrenergic blocker atenolol as a first approach. We got a decrease in the DBI, PI, and in the marker of lipoxidative damage to proteins MDAL, just with 2 weeks of atenolol treatment in mice (Sánchez-Roman, 2010). In view of these results, atenolol treatment seems to be a promising manipulation to demonstrate the causal relation between membrane lipid unsaturation degree and longevity, as well as other possible genetic manipulation in the fatty acid elongation pathway (Zadravec et al., 2011).

Then, the overall aim of this thesis would be to determine if experimental manipulations like atenolol treatment, alone or combined with methionine restriction on the diet, as well as the lack of the Elov12 gen, can improve related parameters with mitochondrial oxidative stress and longevity in mammals. This main goal can be resolve by means of many specific goals: 1.To probe if the effect of the short term treatment with atenolol (2 weeks) in mice could be extrapolate to Wistar rats. 2. To test if the decrease of the fatty acid unsaturation degree by the  $\beta$ -1 adrenergic

receptor blockade with atenolol is able to increase maximum lifespan in B6D2F1 mice. 3. To evaluate the effects of atenolol treatment, methionine restriction and both together during 7 weeks on oxidative stress and aging in Wistar rat liver. 4. To analyze the effects of the lack of the Elov12 gen on lipid profile, mitochondrial function and oxidative stress in 127sv mouse liver.

## RESEARCH CONTENTS

### 1. Short time atenolol effect on mitochondrial oxidative stress in the rat heart

This investigation was carried out to determinate if the inhibition of the  $\beta$ -1 adrenergic signaling by atenolol could be extrapolated to longer live species and more heterogenetic animals like Wistar rat, since C57BL/6 mice are a specific strain with a similar genome.

Atenolol treatment added to drinking water during 2 weeks, significantly decreased peroxidizability index, lipoxidative damage to proteins, NDUFA9 complex I subunit and MnSOD amount. On the other hand, atenolol treatment did not change the mitochondrial ROS generation rate and the oxidative damage to heart mitochondrial DNA. This results agree with the previous one in mouse heart (Sanchez-Roman et al., 2010), and support the possibility that the increase in lifespan of AC5KO mouse could be due to the decrease in the fatty acid unsaturation degree, lipid peroxidation and consequently in lipoxidative damage to proteins.

### 2. Long time atenolol effect on mitochondrial oxidative stress, behavior, immune and heart parameters in B6D2F1 mouse heart and skeletal muscle

A recent work in *C. elegans* shows a correlation between the fatty acid unsaturation degree and longevity in different strains of genetically modified long lived worms (Shmookler Reis et al., 2011). However, no experimental research is focused on demonstrate causality of this correlation in mammals, due to the implicit problems that it can generate. Taking an advantage of atenolol capacity in the change the membrane fatty acids unsaturation degree, we decided to test, for the first time, the hypothesis of the low fatty acid unsaturation degree role in longevity extension.

Long term atenolol treatment increased p-ERK protein amount, showing the effective blocking of the  $\beta$ 1-adrenergic signaling pathway (Yan et al., 2007). Atenolol also decreased, for the first time in mammals, fatty acid unsaturation degree in heart and skeletal muscle mitochondrial membranes, changing their lipid profile to one like long lived mammal species. This fact is due to a decrease in the highly unsaturated fatty acid 22:6n-3 and the increase in the 18:1n-9, induced for a peroxisomal  $\beta$ -oxidation and delta-6 desaturase activity decrease and delta-9 desaturase activity increase. Atenolol treated animals showed less visceral fat amount, as well as oxidative, lipoxidative and glycoxidative damage to proteins in both tissues and mitochondrial DNA damage in heart. Besides, this drug improved several immune and behavioral functions, and some aging related changes were totally or partially reverted, as membrane fatty acid unsaturation degree, immunity and behavior. In spite of all the advantages, atenolol treatment did not extend life span in mice. Curiously, atenolol treatment only significantly decreased longevity in very long lived animals (between 1,000 and 1,275 days old), the same time period in which a significantly decrease of heart rate was detected. This agree with current metha-analysis in humans (Lindholm et al., 2005) that indicate that atenolol treatment can decrease heart rate too much (Bangalore et al., 2008), because a secondary effect of the drug, explaining the earlier death of atenolol treated compared to control animals. The same happened in another longevity study with different  $\beta$ -blockers (Spindler et al., 2013).

### 3. Study of the interaction between dietary methionine restriction and atenolol treatment in Wistar rat liver.

In previous works in our research group, it was tested the additive effect of these two treatments together in the decrease of fatty acid unsaturation degree, the amount of Complexes II and III and p-ERK as well as oxidative damage to proteins in Wistar rat heart (Sanchez-Roman et al., 2013). In view of that, we wonder if these good changes will extend to the rest of organism, or it only works in the main atenolol target organ (heart). Then, we decided to focus our study in other tissues with less  $\beta$ -1 receptors but very important in metabolism and nutrition, like the liver.

In this case, we found a decrease in mitochondrial ROS production in the complex I in the methionine restricted animals groups, while atenolol treatment does not have any effect in this parameter. The same happened when we studied oxidative damage to mitochondrial DNA, which only decrease thanks to methionine restricted diet. Changes in fatty acid composition neither related indexes (DBI and PI) was not seen in this model, due to the low presence of  $\beta$ -1 adrenergic receptors in liver. MetR, alone or combined with atenolol, was able to decrease respiratory chain complexes and AIF protein, and increase the amount of p-ERK protein. Related to oxidative, lipoxidative and glycoxidative damage to proteins, all of them decreased with MetR but these markers did not change after atenolol treatment.

#### 4. Study of lipid profile, mitochondrial function and oxidative stress in Elovl2KO mice.

After pharmacological (atenolol) and dietary (MetR) approximations to act on the two main factors directly related with longevity (low mitochondrial ROS production and low fatty acid unsaturation degree), we decided also to test a genetic manipulation: the lack of the Elovl2 gen. The study was mainly focused in the second parameter: the fatty acid unsaturation degree, since Elovl2 gen codify to the protein elongase 2, essential in the synthesis pathway of PUFAs.

Elovl2KO mice showed a reduced mitochondrial function, as demonstrate their low RCR. At the same time, they show a lower DBI and PI due to lipid membrane redistribution for the strongly decrease of the highly unsaturated fatty acid 22:6n-3 and the increase of the less saturated 18:1n-9. These changes in lipid profile led to a significant decrease in the lipoxidative damage marker to proteins MDAL, as happens in long lived animals. Changes in the amount of mitochondrial complexes was not detected, neither in the protein of the outer mitochondrial membrane mitoNEET.

In spite of this contradiction between the increase in the membrane resistant to oxidative damage and the low efficiency of mitochondrial respiration in Elovl2KO mice, one related work has been recently published helping to explain these results. In this investigation, the authors found an increase in the *C. elegans* longevity in spite of a decrease in mitochondrial respiration (Houtkooper et al., 2013). In this way, new

longevity models showing a decrease in mitochondrial respiration as an adaptation could appear, opposite to the models established until now that an increase in mitochondrial respiration (rapamycin) occurs.

## CONCLUSIONS

- ◆ Short term atenolol treatment decreases fatty acid unsaturation degree in Wistar rat heart mitochondria and the lipoxidative damage to proteins.
- ◆ Long term atenolol treatment decrease body fat amount, DBI and PI and markers of oxidative damage to proteins in old mice heart and skeletal muscle. Improvements on immune system and behavior were seen too, as well as a decrease in oxidative damage to mitochondrial DNA in heart and a increase in p-ERK protein amount in both tissues. These changes do not get to increase maximum lifespan probably due to drug secondary effects, like an increase in heart rate in very old mice.
- ◆ Atenolol and MetR combined treatment did not have additive effects in rat liver. The observed changes were due only to MetR treatment. This fact suggest that atenolol acts in a specific way on its target organs (heart and skeletal muscle), and its effect in different tissues are very small.
- ◆ The lack of the gen Elov12 lead to a change in the lipid profile in mouse liver mitochondria, decreasing the DBI, PI and lipoxidative damage to proteins. On the other hand, Elov12KO mouse liver mitochondria showed a decreased RCR.

## BIBLIOGRAPHY

- Bangalore, S., Sawhney, S., Messerli, F.H., 2008. Relation of beta-blocker-induced heart rate lowering and cardioprotection in hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 52, 1482-1489.
- Gredilla, R., Barja, G., 2005. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology.* 146, 3713-3717.
- Harman, D., 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 20, 145-147.
- Houtkooper, R.H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moullan, N., Katsyuba, E., Knott, G., et al., 2013. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature.* 497, 451-457.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttemer, W.A., 2007. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev.* 87, 1175-1213.
- Lindholm, L.H., Carlberg, B., Samuelsson, O., 2005. Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *Lancet.* 366, 1545-1553.

- Lopez-Torres, M., Barja, G., 2008. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta*. 1780, 1337-1347.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson, J.E., Jr., 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*. 15, 575-591.
- Pamplona, R., Barja, G., 2011. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology*. 12, 409-435.
- Pamplona, R., Barja, G., Portero-Otáñ, M., 2002. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann N Y Acad Sci*. 959, 475-490.
- Sanchez-Roman, I., Barja, G., 2013. Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: role of methionine restriction. *Exp Gerontol*. 48, 1030-1042.
- Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Naudi, A., Jove, M., Gomez, J., Lopez-Torres, M., et al., 2013. Independent and additive effects of atenolol and methionine restriction on lowering rat heart mitochondria oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr*.
- Sanchez-Roman, I., Gomez, J., Naudi, A., Ayala, V., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., et al., 2010. The beta-blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage, and increases extracellular signal-regulated kinase signaling in the heart of C57BL/6 mice. *Rejuvenation Res*. 13, 683-693.
- Shmookler Reis, R.J., Xu, L., Lee, H., Chae, M., Thaden, J.J., Bharill, P., et al., 2011. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging (Albany NY)*. 3, 125-147.
- Spindler, S.R., Mote, P.L., Li, R., Dhahbi, J.M., Yamakawa, A., Flegal, J.M., et al., 2013. beta1-Adrenergic receptor blockade extends the life span of *Drosophila* and long-lived mice. *Age (Dordr)*. 35, 2099-2109.
- Yan, L., Vatner, D.E., O'Connor, J.P., Ivessa, A., Ge, H., Chen, W., et al., 2007. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell*. 130, 247-258.
- Zadavec, D., Tvrdik, P., Guillou, H., Haslam, R., Kobayashi, T., Napier, J.A., et al., 2011. ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J Lipid Res*. 52, 245-255.